



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità – Indirizzo Biologia Animale
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Area 05 Scienze Biologiche – Settore Scientifico Disciplinare BIO/08 Antropologia

**L'IMPIEGO DELLA MORFOMETRIA GEOMETRICA E IL
CONTRIBUTO DELLA CITOGNETICA NELLO STUDIO
DELLA TRIBÙ CERCOPITHECINI (ORDINE *PRIMATES*)**

LA DOTTORESSA
STEFANIA LO BIANCO

IL COORDINATORE
PROF. MARCO ARCULEO

IL TUTOR
PROF. LUCA SINEO

CICLO XXVI
ANNO 2016

INDICE

ABSTRACT	2
IPOTESI	3
OBIETTIVI DELLA RICERCA	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 DESCRIZIONE DELLA TRIBÙ CERCOPITHECINI	5
1.2 SISTEMATICA	6
1.3 UN SECOLO DI RICERCA	8
1.4 LO SCENARIO EVOLUTIVO	9
1.5 I GENERI <i>ALLENOPITHECUS</i> E <i>MIOPITHECUS</i>	12
1.6 IL GENERE <i>ERYTHROCEBUS</i> E I (PRESUNTI) GENERI <i>CHLOROCEBUS</i> E <i>ALLOCHROCEBUS</i>	16
1.7 IL GENERE <i>CERCOPITHECUS</i> E I SUOI “SPECIES GROUPS”	21
1.8 L’EVOLUZIONE NEI RIFUGI PLEISTOCENICI E LA DISTRIBUZIONE ATTUALE	26
2. MATERIALI E METODI	33
2.1 LA MORFOMETRIA GEOMETRICA	33
2.1.1 IL CRANIO	33
2.1.2 LA TECNICA D’INDAGINE	34
2.1.3 IL PROTOCOLLO	35
2.1.4 IL CAMPIONAMENTO	39
2.1.5 LE ANALISI STATISTICHE	41
2.2 LA CITOGNETICA	46
2.2.1 INTRODUZIONE	46
2.2.2 I PROTOCOLLI	48
2.2.3 IL CAMPIONAMENTO	53
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	55
3.1 LA MORFOMETRIA GEOMETRICA	55
3.2 LA CITOGNETICA	70
4. CONCLUSIONI	80
5. COLLABORAZIONI	85
6. BIBLIOGRAFIA	87
7. ALLEGATI	101
7.1 TABELLE	101
7.2 PROTOCOLLI DI LABORATORIO	107
7.3 PUBBLICAZIONI	109
7.4 ATTIVITÀ SVOLTE	116
8. RINGRAZIAMENTI	118

ABSTRACT

Geometric Morphometric and Cytogenetic analyses to study the tribe Cercopithecini

The tribe Cercopithecini is a large and colourful taxon of African primates. Together with the tribe Papionini, it belongs to the subfamily Cercopithecinae (Gray, 1821). Despite several studies carried on the present species of Cercopithecini (guenons and sister genera), up to date a strong and clear systematics is missing. The evolutionary relationships inside the tribe are controversial, as are the numbers of genera and species. This lack prevents our full comprehension of the evolution of the tribe.

*We decided to investigate the tribe Cercopithecini through the use of two methodologies: geometric morphometrics and cytogenetics. The geometric morphometric survey was conducted on 1126 crania and 1067 mandibles of 42 Catarrhini species to identify the most extreme differences in skull shape, to test the morphometric independence and validity of the taxa *Chlorocebus* and *Allochrocebus* and to investigate the existence of arboreal or terrestrial features on Cercopithecini skulls. Cytogenetic techniques were focused on the human chromosomes 20 and 21 synteny (HSA20/21) to investigate the reliability of the tribe and support the morphometric data.*

*We recognized four clear sister genera inside the tribe, *Allenopithecus*, *Erythrocebus*, *Miopithecus* and *Cercopithecus*, which showed cranial differences mainly in facial bone height and neurocranial length. With respect to the mandibles, we noted that the length of the bodies and rami influenced the clustering of genera. *Chlorocebus* and *Allochrocebus* mildly differed from the morphometric shape of genus *Cercopithecus* skull in facial bone and mandibular rami heights but the morphometric cluster is the same. The clustering highlighted relies more on size and diet than on arboreal and terrestrial attitudes. From the karyological point of view, the widespread presence of the HSA20/21 synteny can be considered a proof of the correct grouping of the genera inside the tribe.*

The morphometric methodology is usually preferred for analyses between taxa with deep morphometric differences or long evolutionary distances. Nevertheless, the clustering of the tribe Cercopithecini in sister genera is supported by geometric morphometrics. Further, the sharing of cytogenetic features supports the reliability of the tribe.

Keywords: Cercopithecini; Guenons; Arboreal; Terrestrial; Geometric morphometrics; Shape; Crania and Mandibles; Cytogenetics; HSA20 and 21; Synteny.

IPOTESI

La tribù dei Cercopithecini è stata ed è tuttora oggetto di numerosi studi per l'ampia variabilità morfologica e le profonde differenze genetiche che caratterizzano le specie al suo interno, nonché per l'assenza di una ricostruzione filogenetica che metta d'accordo i diversi approcci metodologici e, dunque, i diversi studiosi. Nonostante i molteplici interventi – o forse proprio per questo –, il più numeroso gruppo di primati africani (Glenn & Cords, 2004) manca di risoluzione nel momento stesso in cui ci si addentra nel livello generico prima e specifico poi (Xing et al., 2007). La disomogeneità delle specie non ha certo aiutato a chiarirne il percorso evolutivo: i generi e gli “species groups” all'interno del genere *Cercopithecus* mostrano discrepanze fenotipiche, citogenetiche e/o ecologiche (Glenn & Cords, 2004), tuttavia l'uniformità anatomica di base (Fleagle, 1998; Cardini & Elton, 2008a; Butynski et al., 2013) e le informazioni contrastanti impediscono una piena comprensione della storia evolutiva del taxon. Inoltre, la sovrapposizione degli habitat e l'attitudine a formare associazioni polispecifiche (Buzzard, 2006) rendono probabili i fenomeni di convergenza ed ibridazione interspecifica (Rowe et al., 1996; Moulin et al., 2008), mentre la situazione politica instabile dei paesi coinvolti, le minacce a cui sono sottoposti gli habitat e la rarità di alcune specie (Ukizintambara & Thébaud, 2002) ostacolano il prosieguo di studi approfonditi sulle popolazioni in natura (Guschanski et al., 2013).

Pertanto, si è deciso di analizzare la tribù dei Cercopithecini, attraverso un'indagine morfometrica su reperti museali e citogenetica su colture cellulari, al fine di indagare le principali differenze nella conformazione dei crani e delle mandibole, testare l'indipendenza e la validità morfometriche di due generi oggetto di ampio dibattito (*Chlorocebus* e *Allochrocebus*), investigare l'esistenza di caratteri arboricoli e/o terricoli nel cranio dei Cercopithecini, individuare l'eventuale presenza di sinapomorfie cromosomiche e analizzare la validità della tribù come raggruppamento.

OBIETTIVI DELLA RICERCA

Nel dettaglio, gli obiettivi di questo progetto di ricerca multidisciplinare possono essere così suddivisi:

- Dal punto di vista metodologico, testare l'utilizzo della morfometria geometrica su crani e mandibole di specie appartenenti alla tribù Cercopithecini, al fine di verificarne l'efficacia nel discriminare i generi e le specie;
- Individuare le principali differenze che caratterizzano i crani e le mandibole;
- Analizzare la validità di un approccio più completo ma ridondante caratterizzato da un numero elevato di *landmarks*, in contrapposizione ad un altro più schematico ma puntuale costituito da un numero ridotto di *landmarks*;
- Attraverso l'analisi di porzioni diverse del cranio, verificare l'esistenza di aree maggiormente soggette a variazione rispetto ad altre;
- Analizzare gli aspetti morfometrici maggiormente discriminanti tra i generi e le specie e calarli all'interno di un contesto coerente;
- Cercare prove morfometriche a sostegno di un ruolo indipendente per i taxa *Chlorocebus* e *Allochrocebus*;
- Verificare la reale affidabilità della dicotomia specie arboricole – specie terricole dal punto di vista morfometrico;
- Individuare il rango tassonomico più basso al quale si può accedere attraverso i caratteri morfometrici indagati;
- Dal punto di vista citogenetico, indagare la presenza di eventi mutazionali che rappresentino snodi chiave nel percorso filogenetico; in particolare, l'esistenza di sintenie cromosomiche, al fine di definire meglio le relazioni tra i taxa;
- Esaminare la validità della tribù come raggruppamento tassonomico;
- Identificare, se presente, il trend evolutivo manifestato dalle specie, in relazione alla grande variabilità cromosomica che le contraddistingue;
- Infine, utilizzare le informazioni ottenute dalle due metodologie per ricavare un fenogramma chiaro e coerente della tribù dei Cercopithecini.

1. INTRODUZIONE

1.1 Descrizione della tribù Cercopithecini

La tribù dei Cercopithecini è un taxon appartenente all'ordine dei Primati e – insieme alla tribù dei Papionini – alla sottofamiglia Cercopithecinae (Gray, 1821). Le specie che vi sono inserite presentano una fossa lacrimale nell'osso omonimo, incisivi laterali ridotti rispetto ai centrali e denti mandibolari con trigonidi allungati e corona alta (Hill, 1966; Groves, 2001). Inoltre, condividono il nome di “cheek-pouch monkeys” per l'onnipresenza di tasche buccali (Groves, 2001; Lambert, 2005), in alternativa allo stomaco sacculare caratteristico della sottofamiglia Colobinae (Hill, 1966). Le due tribù sono state distinte sulla base della differente morfologia dei molari inferiori, della variabilità del numero cariotipico e della presenza di sinapomorfie: da un lato i Papionini, caratterizzati da ipoconulide sul terzo molare inferiore, ridotta variabilità polimorfica e numero cromosomico invariabilmente pari a 42; dall'altro i Cercopithecini, mancanti di ipoconulide ma con quattro cuspidi sul terzo molare, contraddistinti da intenso *reshuffling* genomico, numeri diploidi variabili da 48 a 72 e sintenia dei cromosomi umani 20 e 21 (HSA20 e HSA21) (Butynski, 2002; Tosi et al., 2003; Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008). La presenza del primo o del secondo insieme di caratteri garantisce l'appartenenza all'uno o all'altro taxon, nonostante alcuni ritengano che l'unico carattere realmente diagnostico per distinguere le due tribù sia il numero diploide (Groves, 2001). Ulteriori caratteristiche, comunque, possono essere aggiunte a quelle già individuate, al fine di consentire un migliore inquadramento delle specie oggetto di studio: i membri della tribù Cercopithecini sono primati con distribuzione esclusivamente sub-sahariana, contraddistinti in generale da corpo snello e struttura generalizzata (Eckhardt, 1979; Leakey, 1988; Fleagle, 1998; Cardini & Elton, 2008a; Butynski et al., 2013), taglia media, dimorfismo sessuale in alcuni casi pronunciato (Fleagle, 1998; Cardini & Elton, 2008b) probabilmente da relazionare al sistema di accoppiamento poliginico (Zuberbühler, 2002), muso poco prognato con mascelle sottili e coda non prensile, immancabilmente più lunga del capo e del corpo sommati insieme (Hill, 1966; Fleagle, 1998; Butynski et al., 2013). La maggiore parte delle specie mostra attitudini forestali (Fleagle, 1998), tuttavia, un gran numero presenta una commistione di tratti arboricoli e terricoli (Kingdon, 1988a). L'uniformità anatomica non è rispecchiata da quella cariotipica, poiché si presentano profondamente diversi nel numero e nella morfologia dei cromosomi (Chiarelli, 1968; Eckhardt, 1979; Stanyon & Sineo, 1983): tra

il valore diploide più basso e quello più alto c'è un divario di 12 coppie cromosomiche e polimorfismi tra cromosomi omologhi emergono anche all'interno della stessa specie (Stanyon & Sineo, 1983; Sineo et al., 1986); in aggiunta, sono stati riscontrati anche dei polimorfismi trans-specifici (TSP), ovverosia varianti alleliche omologhe che ricorrono in specie filogeneticamente correlate (Sineo, 1990; Klein et al., 1998; Moulin et al., 2008). Dal punto di vista etologico, i Cercopithecini si differenziano dai Papionini per la struttura sociale generalmente uni-maschile, la quasi del tutto assente sovrapposizione di areale tra branchi specifici (i.e.: *troops*) e la formazione di associazioni polispecifiche nelle specie forestali (Gautier, 1988; Gautier-Hion, 1988; Groves, 2001). La mancanza di una *troop* gerarchicamente organizzata e le abitudini prevalentemente arboricole sembrano essersi tradotte nell'evoluzione di un sistema di comunicazione visiva limitato, con conseguente ridotto utilizzo di segnali facciali e volti poco mobili (Kingdon, 1988b; Groves, 2001; Butynski et al., 2013). I vivaci pattern facciali mostrati principalmente dai membri del genere *Cercopithecus* sembrerebbero, dunque, circoscritti al riconoscimento specifico (Guschanski et al., 2013; Allen et al., 2014). La comunicazione acustica, invece, assume un ruolo predominante, specialmente nelle specie forestali, anche in risposta a specifiche pressioni sessuali (Zuberbühler, 2002); vocalizzazioni anti-predatorie e di avvertimento sono comunque presenti, meno frequentemente nelle specie che non vivono in associazioni polispecifiche (Gautier-Hion, 1988). L'integrazione tra questi e i precedenti fattori consente di definire genericamente cosa sia un cercopiteco *sensu lato* (s.l.), giustificandone l'appartenenza ad una tribù differente da quella dei parenti Papionini. Tuttavia, ad un rango tassonomico inferiore, lo stesso potere risolutivo non è mantenuto: finora, infatti, non è stata proposta una sistematica robusta e coerente che sia riuscita nell'intento di chiarificare i rapporti all'interno della tribù dei Cercopithecini. Tutte le sistematiche presentate entrano in contraddizione tra loro per la posizione filogenetica di una o più specie e, persino, per il numero di generi e specie riconosciuti come validi (Xing et al., 2007). Quanto più si approfondisce la conoscenza di questo taxon, infatti, tanto più difficile risulta far convergere tutte le informazioni verso un'unica direzione (Lehn, 2004).

1.2 Sistematica

Le più recenti revisioni tassonomiche riguardanti i Cercopithecini risalgono agli inizi del XXI secolo (Groves, 2001; Grubb et al., 2003) (Sez. Allegati, Tab. 1). Nella classificazione di Groves (2001), i generi ritenuti legittimi risultano cinque: *Allenopithecus*, *Miopithecus*,

Erythrocebus, *Cercopithecus* e *Chlorocebus*. Due anni dopo, Grubb et al. (2003) propongono una nuova revisione, in cui il numero dei generi viene abbassato a quattro: *Allenopithecus*, *Miopithecus*, *Erythrocebus* e *Cercopithecus*. Il genere mancante, *Chlorocebus*, sulla scia di una lunga tradizione (Hill, 1966), viene reinserito all'interno dell'ampio e variegato *Cercopithecus*, il più vasto genere di primati sul continente africano (Rowe et al., 1996). Benché non siano stati proposti ulteriori studi tassonomici nel decennio che ci separa dall'opera di Grubb et al. (2003), la maggior parte dei lavori riguardanti la tribù dei Cercopithecini ha ritenuto validi i cinque generi riconosciuti da Groves nel 2001 (Moulin et al., 2008; Chatterjee et al., 2009; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013). Alcuni autori hanno recentemente aggiunto un sesto genere, *Allochrocebus* (Grubb, 2006; Moulin et al., 2008; Fleagle et al., 2010; Butynski et al., 2013; Gilbert et al., 2014), le cui specie (*lhoesti*, *preussi* e *solatus*) sono considerate monofiletiche (Gautier et al., 2002) e responsabili della parafilia del genere *Cercopithecus* (Grubb et al., 2003; Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011). Dei quattro generi su cui vi è unanime accordo, *Allenopithecus* e *Erythrocebus* sono monospecifici, comprendenti rispettivamente le sole specie *A. nigroviridis* (ANI) e *E. patas* (EPA), mentre il genere *Miopithecus* è costituito da due specie (*M. talapoin*, MTA e *M. ogouensis*, MOG). *Cercopithecus* presenta un numero di specie variabile tra 19 (Grubb et al., 2003) e 25 (Groves, 2001). Al suo interno possono essere riconosciuti sette "species groups", definibili come gruppi monofiletici di taxa allopatrici (Grubb, 2006): *dryas*, *neglectus*, *diana*, *mitis*, *mona*, *cephus* e *hamlyni*. I primi due sono monospecifici (*C. dryas*, CDR e *C. neglectus*, CNE), mentre i successivi quattro presentano numeri variabili. Nella classificazione di Groves (2001), contengono rispettivamente due (*C. diana*, CDI e *C. roloway*, CRO), cinque (*C. mitis*, CMI, *C. nictitans*, CNI, *C. albogularis*, CAL, *C. doggetti*, CDO e *C. kandti*, CKA) e sei specie (*C. mona*, CMO, *C. campbelli*, CCA, *C. lowei*, CLO, *C. pogonias*, CPO, *C. denti*, CDE e *C. wolffi*, CWO; *C. cephus*, CCE, *C. ascanius*, CAS, *C. petaurista*, CPE, *C. erythrotis*, CER, *C. erythrogaster*, CERY e *C. sclateri*, CSC). Grubb et al. (2003) considerano CRO, CLO, CDE + CWO e CAL sottospecie rispettivamente di *diana*, *campbelli*, *pogonias* e *mitis*. L'ultimo gruppo – *hamlyni* – nelle due classificazioni citate risulta monospecifico, essendo la scoperta di una nuova specie presumibilmente imparentata con CHA (*C. lomamiensis*, CLOM) posteriore alle loro pubblicazioni (Hart et al., 2012) (Tab. 1). Inoltre, sia Groves (2001) che Grubb et al. (2003) individuano un ottavo gruppo – *lhoesti* – comprendente le tre specie da altri autori attualmente separate ed inserite nel genere *Allochrocebus*. Il quinto genere di Groves (2001) – *Chlorocebus* – è costituito da sei specie (*C. aethiops*, CAE, *C. cynosuros*, CCY, *C. djamdjamensis*, CDJ, *C. pygerythrus*, CPY, *C.*

sabaeus, CSA e *C. tantalus*, CTA). Grubb et al. (2003), di queste sei specie, ne riconoscono soltanto una (*Cercopithecus aethiops*) e la inseriscono, insieme alle sue cinque sottospecie, nel nono gruppo del genere *Cercopithecus* (gruppo *aethiops*). La validità di questi raggruppamenti tassonomici è stata largamente accettata, tuttavia rimangono ancora da chiarire i rapporti che intercorrono tra di essi e il numero di specie e sottospecie che li costituiscono (Xing et al., 2007).

1.3 Un secolo di ricerca

La grande variabilità del più largo e diverso taxon di primati dell'Africa continentale (Glenn & Cords, 2004; Guschanski et al., 2013) e la presunta assenza di fossili antecedenti ai 3 milioni di anni (ma) (Leakey, 1988; Butynski, 2002; Disotell & Raam, 2002; Tosi et al., 2005) hanno contribuito ad ostacolare il raggiungimento di una piena comprensione di quella che potrebbe essere stata l'evoluzione del gruppo. Dalla creazione del genere *Cercopithecus* (Linneo, 1748), numerosi studi si sono susseguiti nel tentativo di ricostruire le relazioni filogenetiche che intercorrono tra gli attuali Cercopithecini (Elliot 1913; Pocock, 1926; Schwarz, 1928). Due lavori, in particolare, si sono occupati di investigare la tribù sotto l'aspetto craniale (Verheyen, 1962), anatomico, ecologico e comportamentale (Hill, 1966), definendo gli *species groups* che ancora oggi vengono utilizzati per distinguere le specie del variegato genere *Cercopithecus*. Più recentemente, ad influenzare l'intero filone di studi evolutivi sono intervenute due teorie: l'aumento del numero cromosomico nel tempo (Chiarelli, 1968; Dutrillaux et al., 1988) e l'esistenza di un clade arboricolo e uno terricolo (Gauthier-Hion et al., 1988). Gli studi cariologici sulla tribù fecero emergere che, a differenza dei loro parenti più prossimi caratterizzati da uniformità cariotipica, i Cercopithecini presentano ampia variabilità nel numero di cromosomi: dal 48 di *nigroviridis* al 72 di *pogonias* e *mitis*, passando attraverso il 54 di *patas* e il 60 dei gruppi *aethiops* e *lhoesti* (Romagno, 2001; O'Brien et al., 2006). Poiché il 48 di *A. nigroviridis* (ANI) è il numero che si avvicina maggiormente al 42 costante del cariotipo dei Papionini e la specie mostra caratteri plesiomorfi condivisi con la tribù sorella (Hill, 1966; Eckhardt, 1979; Fleagle, 1998; Chatterjee et al., 2009), ANI venne considerata il più ancestrale cercopiteco s.l.. Le altre specie, invece, presentando un cariotipo in apparenza derivato, furono classificate come più recenti (Dutrillaux et al., 1988). Da tali premesse prese avvio la teoria dell'aumento del numero cromosomico, secondo la quale l'evoluzione dei Cercopithecini è stata guidata da ripetuti eventi di fissione cromosomica che, pur mantenendo quasi invariato il contenuto genetico (Dutrillaux et al., 1978), hanno aumentato,

esponenzialmente e in maniera lineare, il numero di cromosomi (Chiarelli, 1968; Dutrillaux et al., 1988). Di conseguenza, in maniera quasi finalistica, le specie con numeri diploidi bassi vennero ritenute più ancestrali di quelle con numeri alti (Eckhardt, 1979), anche in ragione della presenza, in quest'ultime, di un gran numero di acrocentrici, generalmente prodotti per fissione (Stanyon & Sineo, 1983; Sineo, 1986). La seconda teoria, proseguendo sulla scia della distinzione citogenetica, aggiunse un taglio principalmente anatomico-ecologico alla classificazione individuando due distinti cluster all'interno del gruppo, uno costituito da specie arboricole e l'altro da specie terricole: le prime, caratterizzate da habitat forestali, adattamenti alla vita sugli alberi e attitudini alla formazione di associazioni polispecifiche, più recenti e con maggiore variabilità cromosomica, sono le specie cui Dutrillaux (1979) assegnava un alto numero cariotipico; le seconde, di ambienti più aperti, con adattamenti cursori alla vita sul terreno, scarsa tendenza a formare *troop* miste e costanza cariotipica, hanno un'origine più ancestrale (Gautier, 1988; Gautier-Hion, 1988; Gautier-Hion et al., 1988). Entrambe le teorie, trovando riscontro in diversi campi d'indagine (dalla citogenetica all'anatomia dello scheletro) hanno ricevuto il supporto dei numerosi studi successivi, specialmente molecolari (Tosi et al., 2004; Moulin et al., 2008; Guschanski et al., 2013; Ravi et al., 2013), che spesso, però, le hanno date per assodate senza reale fondamento.

1.4 Lo scenario evolutivo

La maggior parte delle datazioni, indipendentemente dalla provenienza del dato, colloca la separazione tra Papionini e Cercopithecini nel Miocene medio (Benefit, 1999: **14-11 ma**; Groves, 2001: **10 ma**; Disotell & Raaum, 2002: **13,5-10,5 ma**; Raaum et al., 2005: **12,9-10,3 ma**; Tosi et al., 2005: **11,5 ma**; Xing et al., 2007: **11 ma**; Perelman et al., 2011: **11,5 ma**; Guschanski et al., 2013: **15-9,6 ma**; Gilbert et al., 2014: **13,9-9,2 ma**). Sporadiche eccezioni anticipano l'evento al Miocene Inferiore (Chatterjee et al., 2009: **18,6 ma**) (Tab. 2). Benché il genoma mitocondriale evolva più in fretta di quello nucleare (Chatterjee et al., 2009) giustificando un'eventuale divergenza anticipata, la datazione non è supportata da altri lavori analoghi (Guschanski et al., 2013); inoltre, la probabilità a posteriori mostrata dai raggruppamenti risulta bassa (Chatterjee et al., 2009). Il divario cronologico tra le diverse datazioni potrebbe apparire geologicamente irrisorio, tuttavia, dal punto di vista climatico e – di conseguenza – vegetazionale, la differenza è considerevole. Nella transizione dal Miocene medio al superiore, infatti, l'espansione delle calotte polari modifica il livello degli oceani, causando un generale abbassamento delle temperature su tutte le terre emerse;

contemporaneamente, la variazione nella direzione dei venti, provoca l'accumulo di materiale sabbioso dal deserto del Kalahari al bacino del Congo, con conseguente inaridimento delle zone tropicali (Maley, 1996). Il clima, diventato freddo e arido (Pickford, 1986), investe il continente africano ben più a nord dell'equatore attuale e favorisce una riduzione dei taxa forestali a vantaggio di specie caratteristiche di climi secchi e ambienti aperti (Maley, 1996). Gli ultimi 15 milioni di anni diventano, così, lo scenario in cui l'Africa tropicale centroccidentale – la porzione di continente in cui ha avuto luogo la radiazione dei Cercopithecini (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013) – subisce profondi cambiamenti climatici e l'evoluzione delle due tribù probabilmente prende strade differenti (Guschanski et al., 2013). Le foreste caldo-umide, oggi così tipiche della fascia equatoriale, nel periodo compreso tra l'Eocene medio e il Miocene medio, si estendevano su tutta l'area che dalla Guinea conduce al Sudan e dal Nord dell'Egitto al Sud del Camerun, in maniera quasi ininterrotta (Maley, 1996); a partire dal Miocene medio, invece, la loro distribuzione si contrae e il paesaggio diventa un mosaico di foresta, boscaglia, prateria e savana (Maley, 1996; Benefit, 1999; Bonnefille, 2010). In questo paesaggio frammentario, arido, lontano dalla fitta foresta tropicale e climaticamente instabile, l'antenato comune di Papionini e Cercopithecini deve essersi progressivamente adattato a vivere tra la boscaglia e la foresta, tra il suolo e i livelli più bassi della copertura vegetale (Pickford, 1986; Leakey, 1988; Benefit, 1999). Tale scenario è rafforzato anche dalle abitudini attuali della maggior parte delle papionine (Tosi et al., 2002) e dal fatto che occupare solo i primi metri in verticale dell'habitat è considerato un tratto primitivo per i Cercopithecini (Rowe et al., 1996). Inoltre, come anticipato all'inizio, tutte le Cercopithecinae condividono la presenza delle tasche buccali, una caratteristica dei primati terricoli (Sineo, 1986), evolutasi un'unica volta nella storia dell'ordine (Lambert, 2005) e sono perfettamente in grado di muoversi sia sul terreno che tra i rami, grazie alla permanenza di una struttura scheletrica indifferenziata (Benefit, 1999; Sineo, 2012a). Osservazioni in natura hanno permesso di verificare come l'utilizzo dei due substrati scandisca le giornate di molte specie (Fleagle, 1998): definirne il grado terricolo o arboricolo risulta, in queste condizioni, molto difficile e poco realistico. L'ambiente variegato e mutevole che alla foresta alterna la boscaglia e alla prateria la savana (Pickford, 1986; Bonnefille, 2010), ad un certo punto del Miocene medio, vede la separazione delle popolazioni presenti negli antenati delle due tribù attualmente riconosciute.

Tuttavia, pur essendo una separazione tassonomicamente netta quella odierna tra le due tribù, i lignaggi non presentano differenze genomiche interspecifiche eccessivamente profonde, forse in ragione della recente speciazione. Un basso livello di divergenza genomica, però,

caratterizza la totalità degli appartenenti alla famiglia Cercopithecidae, dunque non è una prerogativa esclusiva delle Cercopithecinae (Perelman et al., 2011). Tale aspetto, da non considerare limitato all'evoluzione genetica delle specie, si potrebbe tradurre, ad esempio, nella difficoltà di riconoscere e datare con esattezza i pochi fossili rinvenuti e, quindi, in un loro ridotto utilizzo. Complice il clima umido dell'Africa tropicale che non favorisce la fossilizzazione (Nichol, 1999) e la difficoltà di intraprendere in loco un'indagine paleontologica, non sono stati ritrovati fossili provenienti dalla parte occidentale del continente. I siti maggiormente conosciuti si ritrovano lungo la Rift Valley orientale e sono associati a rinvenimenti di ominidi (Benefit, 1999; Bonnefille, 2010). Nessun fossile africano appartenente con certezza ai Cercopithecini è stato datato prima del Pliocene (Butynski, 2002; Disotell & Raaum, 2002). Tuttavia, una recente scoperta proveniente da un sito negli Emirati Arabi Uniti testimonia di un fossile appartenente alla fauna del tardo Miocene (~ 7 ma), che gli autori riconoscono come il più antico reperto di cercopiteco e il primo al di fuori del territorio africano (Gilbert, 2012). Tale scoperta, se confermata, rappresenterebbe un'ulteriore prova a sostegno dell'origine miocenica del gruppo, smentendo l'ipotesi di una sua recente apparizione plio-pleistocenica (Gilbert et al., 2014). Rimane da confermare l'origine centroccidentale della tribù, nonostante, su questo aspetto, non sembra esserci disaccordo tra gli studiosi, principalmente sulla base della distribuzione relittuale delle specie ritenute ancestrali (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013; Butynski et al., 2013).

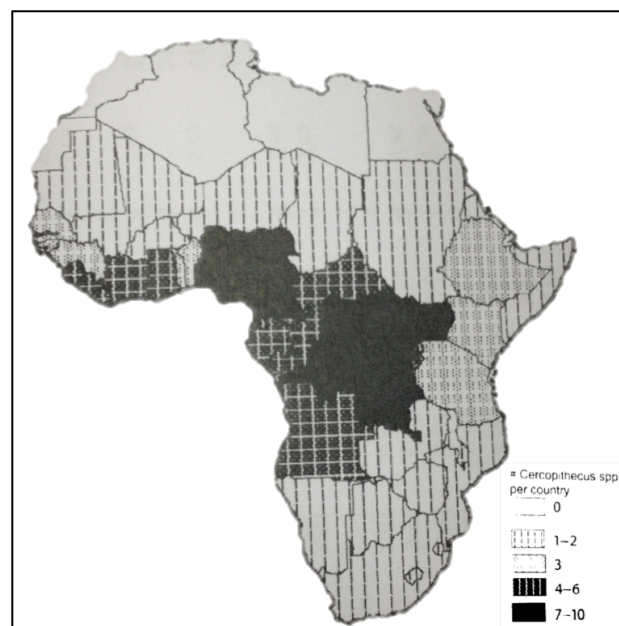


Figura 1. Pattern di distribuzione attuale delle specie della tribù Cercopithecini (Ukizintambara & Thébaud, 2002).

Osservando la distribuzione attuale delle specie, è possibile notare come la maggior parte di esse si collochi tra il Senegal e l'Uganda, con ampie zone di sovrapposizione di areale (Fig. 1). Poche specie si trovano al di là della Rift Valley e al di sotto del bacino del Congo (Rowe et al., 1996), ad indicarne, forse, una conquista successiva. Oggi la porzione di territorio compresa tra gli stati Guinea – Ghana e Nigeria – Repubblica Democratica del Congo (RDC) è caratterizzata dalla foresta umida guineo-congolese ed è circondata da una fascia di transizione foresta/savana/boscaglia (Bonnefille, 2010). Lo scenario eocenico di un largo corridoio ininterrotto di foresta umida tra ovest ed est non ha fondamento, poiché, già prima del Pliocene, il clima e la vegetazione si mostravano instabili e non uniformi (Bonnefille, 2010; Guschanski et al., 2013). Pertanto, sulla base delle informazioni paleo-ambientali, è lecito ipotizzare che questa porzione di Africa centroccidentale fosse caratterizzata da un ambiente a mosaico e che proprio questo ambiente abbia favorito la speciazione dei neo-Cercopithecini, primati dalle abitudini semi-terricole (Eckhardt, 1979; Kingdon, 1988a; Leakey, 1988; Pickford & Senut, 1988) e dall'aspetto papiomorfo, con cariotipo molto simile a quello del genere *Macaca* (Stanyon & Sineo, 1983).

1.5 I generi *Allenopithecus* e *Miopithecus*

In almeno una delle specie di Cercopithecini, *A. nigroviridis* (ANI), è ancora possibile riconoscere una morfologia papionina (Hill, 1966; Eckhardt, 1979; Fleagle, 1998; Chatterjee et al., 2009) che ha indotto la quasi totalità degli studiosi a collocare il taxon in questione alla base dell'albero filogenetico della tribù (Rowe et al., 1996; Fleagle, 1998; Gautier et al., 2002; Grubb et al., 2003; Xing et al., 2007; Perelman et al., 2011). ANI, attualmente, occupa un areale limitato alle paludi (*swampy areas*) del bacino del Congo (ex Zaire) dove, con andatura quadrupede, alterna la terraferma al livello inferiore degli alberi (Rowe et al., 1996). Come già anticipato, la specie è caratterizzata dal numero diploide più basso tra tutti i Cercopithecini ($2n = 48$), dall'integrità dell'HSA5 (separato nelle altre specie) e dalla permanenza di caratteri primitivi in comune con i papionini: il cariotipo conservativo, la convessità dei molari (*molar flare*), il rigonfiamento dei genitali femminili, le callosità ischiatiche fuse nei maschi, le orecchie appuntite, una struttura sociale con più maschi all'interno di uno stesso gruppo (*multimale social system*) e le vocalizzazioni brevi ma acute (Stanyon & Sineo, 1983; Gautier, 1988; Groves, 2001; Tosi et al., 2002; Grubb et al., 2003; Tosi et al., 2003; Stanyon et al., 2005; Gilbert et al., 2014). Alcune di queste caratteristiche plesiomorfe (il numero diploide basso, le protuberanze dentali, l'organizzazione sociale, il repertorio acustico e la visibilità

dell'estro femminile) sono condivise anche dal genere *Miopithecus* che, per tale ragione, è stato collocato in posizione basale insieme a ANI (Gautier, 1988; Groves, 2001; Tosi et al., 2002; Tosi et al., 2003). A differenza di *A. nigroviridis* (ANI), però, le specie *talapoin* (MTA) e *ogouensis* (MOG) sono caratterizzate da un fenomeno di nanismo che le rende le più piccole catarrine esistenti e dalla permanenza di caratteri neotenici (Fleagle, 1998), da abitudini prevalentemente arboricole (Rowe et al., 1996) e dall'uso di espressioni facciali e vocalizzazioni simili a quelle usate dai Papionini (Groves, 2001). Ciò pare suggerire che, relativamente presto nella storia della tribù, sia avvenuta una separazione tra il lignaggio che ha portato ad ANI e quello da cui si sono evoluti i miopiteci: tale precoce separazione è supportata anche dal *painting* cromosomico (Stanyon et al., 2005; Stanyon et al., 2011). Perelman et al. (2011) collocano questa divergenza a 8,22 ma, la comparsa della specie *A. nigroviridis* a 7,63 ma e della specie *M. ogouensis* a 7,28 ma; leggermente anteriori le datazioni di Tosi et al. (2005) che si attestano sui 9,3 ma per la separazione di ANI e sugli 8,1 ma per la comparsa degli altri generi. Guschanski et al. (2013) individuano la prima radiazione di Cercopithecini approssimativamente intorno ai 9,6 ma e la comparsa dei generi *Allenopithecus* e *Miopithecus* tra 9,6 e 9,3 ma, in linea con l'origine della radiazione della tribù collocata da Disotell & Raaum (2002) a 9,5 ma e con la comparsa dei due cladi principali datata 8,8 ma da Haus et al. (2013) (Sez. Allegati, Tab. 3). Nonostante la concordanza tra i diversi studi suggerisca l'attendibilità delle ricostruzioni, non tutte le datazioni sono supportate in maniera robusta, in particolar modo per quel che riguarda la cronologia delle speciazioni. Benché da un punto di vista ecologico e sistematico gli alberi più attendibili sembrano quelli basati sul DNA nucleare (Tosi et al., 2005; Perelman et al., 2011; Haus et al., 2013), dal punto di vista statistico il mtDNA sembra conferire maggiore solidità alla filogenesi, in termini di massima verosimiglianza e analisi della parsimonia (Disotell & Raaum, 2002; Guschanski et al., 2013). Questi motivi contribuiscono ad ostacolare il raggiungimento di un unanime consenso per le ricostruzioni filogenetiche basate sulle analisi molecolari. Della separazione cui si assiste nel tardo Miocene, potrebbero essere responsabili gli eventi geologici che hanno coinvolto la porzione di Africa in cui le specie si sono evolute. L'origine centroccidentale del taxon dei Cercopithecini (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013) si evidenzia nella distribuzione attuale dei generi *Allenopithecus* e *Miopithecus*, compresa tra Congo (RDC), Camerun e Gabon (Fig. 2). Tuttavia, la loro distinzione geografica è netta, poiché ANI si trova confinata all'interno del bacino del Congo, mentre MTA e MOG se ne distribuiscono al di fuori (Rowe et al., 1996; Butynski et al., 2013): il bacino stesso, dunque, considerate le sue dimensioni e la

sua complessità, avrà sicuramente agito da barriera alla dispersione delle specie e da innesco per il loro differenziamento genetico (Guschanski et al., 2013).

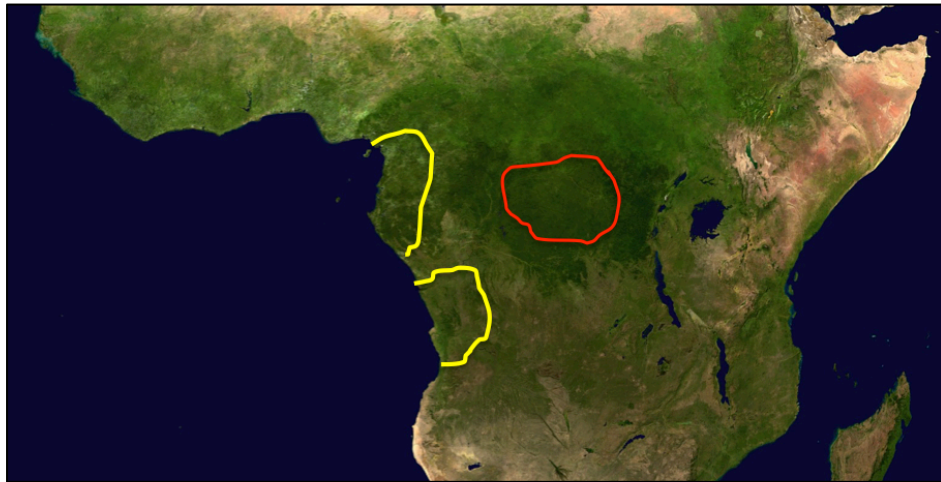


Figura. 2. Distribuzione dei generi *Miopithecus* (in giallo) e *Allenopithecus* (in rosso) (Hill, 1966; Heads, 2011).

La collocazione attuale del bacino idrografico dell'ex Zaire è il frutto di numerosi eventi di sollevamento e abbassamento della crosta terrestre, dovuti a fenomeni tettonici, che ne hanno alterato ripetutamente la quota rispetto al livello del mare: studi geologici hanno rivelato che, nel tardo Giurassico, esisteva un collegamento tra la sponda orientale del bacino e l'oceano Indiano; nel Cretaceo inferiore, la comparsa di un rift nell'oceano Atlantico, estesosi fin dentro la crosta continentale africana (*Benue trough*), ha diviso l'Africa centrale da quella occidentale, mettendo in contatto la porzione settentrionale del bacino con il mare interno in cui, attualmente, si estende il Sahara (Heads, 2011); nel Cenozoico, ulteriori movimenti della crosta oceanica hanno riattivato il Sistema di Rift Centro-Africano (CARS), una faglia che si estende dal Golfo di Guinea al Sudan, innalzando il bacino in direzione sud-est; al confine tra l'Eocene e l'Oligocene, invece, la riattivazione del Sistema di Rift Orientale (EAR) lo ha sollevato verso occidente (Stankiewicz & de Wit, 2006; Heads, 2011). Il bacino, a questo punto, si è ritrovato circondato unicamente da terre emerse, fino a quando, nel Miocene, un reticolo fluviale non l'ha nuovamente collegato all'oceano Atlantico (Stankiewicz & de Wit, 2006).

Successivi fenomeni tettonici, nel periodo in cui i primi Cercopithecini facevano la loro comparsa, possono essere stati responsabili di allagamenti o formazioni di rilievi, in grado di alterare le caratteristiche climatico-vegetazionali e le possibilità dispersive degli organismi coinvolti. Sia *Allenopithecus* che *Miopithecus* sono caratterizzati da capacità natatorie (Fleagle, 1998; Colyn & Deleporte, 2002) e i corsi d'acqua non necessariamente rappresentano una barriera alla dispersione (Oates, 1988; Kawamoto et al., 2013). Tuttavia l'Africa

centroccidentale è attraversata da un reticolo idrico imponente che ha subito modifiche nel tempo (Eriksson et al., 2004; Heads, 2011) e tali modifiche di portata, percorso e/o altitudine possono aver contribuito alla separazione dei taxa. Le popolazioni distribuite sul versante centroccidentale del continente, infatti, in seguito ad uno di questi fenomeni, potrebbero essere rimaste isolate le une dalle altre e ciò ne avrebbe favorito la speciazione. Tuttavia, nonostante i caratteri in comune con il *sister group* Papionini, la posizione filogenetica dei due generi *Allenopithecus* e *Miopithecus* non è stata ancora pienamente confermata (Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013). Entrambi i lignaggi potrebbero rappresentare linee evolutive indipendenti, imparentate con gli eritrocebi e i cercopiteci *sensu stricto* (Guschanski et al., 2013). I miopiteci, presentando caratteri neotenici nel cranio (Lo Bianco et al., *submitted*) e taglia ridotta, si mostrano unici nel loro percorso evolutivo. La diminuzione della taglia che li contraddistingue appare precoce, sulla base del ritrovamento di denti fossili pliocenici di dimensioni ridotte, identici a quelli degli odierni miopiteci (Plavcan et al., 2013). Nonostante le specie attuali siano prevalentemente arboricole e diffuse tra il Camerun e l'Angola (Fig. 2) (Rowe et al., 1996), i reperti sono stati ritrovati in Kenya, associati ad habitat secchi e aperti: tale indizio rappresenta una prova a sostegno dell'origine dei Cercopithecini in ambienti a mosaico e del loro posteriore adattamento ad ambienti differenti (Plavcan et al., 2013). Inoltre, la presenza di tratti terricoli nell'andatura e nello scheletro degli attuali miopiteci (Gautier, 1988; Kingdon, 1988a) avvalorare l'ipotesi della semi-terrestrialità come ancestrale forma locomotoria (Gautier, 1988). Sulla base delle informazioni riportate, è lecito ipotizzare che la loro occupazione della copertura forestale possa rappresentare una conquista successiva. Infatti, il moderno genere *Miopithecus* clusterizza geneticamente con le specie del genere *Cercopithecus* (Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Head, 2011; Perelman et al., 2011; Gilbert et al., 2014), caratterizzate da stili di vita principalmente arboricoli, nonostante la capacità di usufruire del terreno per gli spostamenti e/o l'approvvigionamento alimentare (Sineo, 2012b). Tuttavia, l'attribuzione di generi o specie ad un determinato lignaggio sembra essere stata condizionata più dalle attitudini ecologiche e dal retaggio di particolari caratteri che da reale vicinanza filogenetica. La dimensione ecologico-locomotoria, infatti, appare più l'adattamento ad esigenze puntuali che un'eredità filogenetica. Mancando robuste prove a sostegno, sarebbe più corretto limitarsi a riconoscere delle preferenze inseritesi su un piano anatomico uniforme (Sineo, 2012a; Lo Bianco et al., *submitted*) e distinguere i cluster attraverso l'impiego di altre differenze. Inoltre, le evidenze paleoclimatiche sembrano negare l'origine arboricola del gruppo e il successivo adattamento alla savana (Tosi et al., 2002; Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013), a favore di

una condizione ancestrale semi-terricola, indirizzata allo sfruttamento del maggior numero di risorse possibili, nel neo-formatosi ambiente a mosaico (Eckhardt, 1979; Benefit, 1999).

1.6 Il genere *Erythrocebus* e i (presunti) generi *Chlorocebus* e *Allochrocebus*

A partire dal Miocene superiore (~ 7,5 ma), una nuova espansione della copertura forestale, avvantaggiata dal clima instabile e piovoso, investe il continente africano: per circa 500mila anni, l'Africa tropicale sarà caratterizzata da ampie foreste pluviali (Bonnefille, 2010), favorevoli all'ulteriore separazione e differenziazione dei lignaggi formati. All'incirca intorno ai 7 ma, tuttavia, la percentuale di superficie arborea subisce un tracollo, a vantaggio del più aperto e arido ambiente di savana (Bonnefille, 2010; Guschanski et al., 2013). In questo contesto, si inserisce un grande evento di speciazione all'interno della tribù dei Cercopithecini: tra i 7,4 e i 6,8 ma compaiono il genere *Erythrocebus*, il gruppo *aethiops* e gli *species groups* del genere *Cercopithecus* (Guschanski et al., 2013). Benché le datazioni mitocondriali siano ancestrali e non unanimemente condivise, si mostrano cronologicamente in linea con le date indicate dagli studi molecolari per la comparsa dei primi taxa (Tosi et al., 2005; Perelman et al., 2011; Gilbert et al., 2014), con il mutevole scenario miocenico (Bonnefille, 2010) e con la quantità di differenze accumulate tra i generi.

E. patas (EPA), unica specie del genere *Erythrocebus*, presenta un'ampia distribuzione dal Senegal all'Etiopia (Rowe et al., 1996; Kamilar et al., 2009; Butynski et al., 2013) (Fig. 3). L'ampio areale ha portato all'evoluzione di differenti forme geografiche, il cui status di sottospecie non è mai stato messo in discussione, mentre il numero è materia di dibattito (Rowe et al., 1996; Groves, 2001; Grubb et al., 2003). Tra i Cercopithecini, è il primate di maggiori dimensioni, con un *range* di peso che oscilla tra un minimo di 4 kg nelle femmine e un massimo di 13 kg per i maschi (Rowe et al., 1996), benché siano stati riportati valori fino a 18 kg (Butynski et al., 2013); sia la taglia corporea che la morfologia cranica divergono dalla media degli altri Cercopithecini, forse in risposta a specifiche pressioni ecologiche (Cardini & Elton, 2008a; Lo Bianco et al., *submitted*). Caratteristica peculiare è la sua capacità di correre con una velocità che può raggiungere i 50 km/h, rendendolo il primate più veloce al mondo (Rowe et al., 1996; Fleagle, 1998; Butynski, 2002): tale caratteristica è frutto di una specializzazione secondaria all'andatura cursoria degli arti e dei tarsi, che si mostrano, infatti, estremamente allungati (Hill, 1966; Fleagle, 1998; Butynski et al., 2013). L'abitudine a muoversi sul terreno e gli adattamenti anatomici ad essa associati hanno portato al suo inserimento all'interno del clade terricolo (Butynski, 2002; Gautier et al., 2002; Xing et al.,

2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Gilbert et al., 2014), nonché ad avallare la teoria di un'origine arboricola del taxon. Tuttavia, posta la natura specializzata dei suoi arti, è ugualmente coerente uno scenario che preveda un'origine semi-terricola e un successivo “perfezionamento” (Kingdon, 1988a): EPA, infatti, vive in ambienti di savana, aridi e aperti, con sporadica presenza arborea e leoni e sciacalli come potenziali predatori, fattori che rendono la corsa un valido espediente per la sopravvivenza (Butynski et al., 2013). Benché la terrestrialità sia stata considerata un carattere derivato, il suo ridotto numero diploide ($2n = 54$) uguale a quello dei miopiteci (Groves, 2001; O'Brien et al., 2006) e la presenza di vocalizzazioni condivise con i miopiteci e i babbuini (Gautier, 1988) ne hanno favorito la collocazione tra le specie più ancestrali (Moulin et al., 2008); tuttavia, l'ipotesi non è universalmente condivisa (Guschanski et al., 2013). Inoltre, gli eritrocebi condividono con *Allenopithecus* e i gruppi *aethiops* e *lhoesti* simile sequenza nucleotidica, numero cromosomico medio-basso, pattern di distribuzione e migrazione comparabili, repertorio di vocalizzazioni simile, ridotta tendenza alla formazione di associazioni polispecifiche, e attitudini in parte terricole (Gautier, 1988; Gautier-Hion, 1988; Gautier et al., 2002; Tosi et al., 2004; Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Stanyon et al., 2011; Guschanski et al., 2013; Haus et al., 2013; Gilbert et al., 2014), nonostante la completa capacità di utilizzare gli alberi come rifugio e/o fonte di cibo (Rowe et al., 1996; Butynski et al., 2013). Tutte queste specie condividono anche una colorazione bluastra dello scroto, carattere coinvolto nella comunicazione intraspecifica come indicatore dello status sociale maschile (i.e.: colore più pallido nei subordinati) e catalizzatore della scelta femminile (Price et al., 1975; Bagnara et al., 2007). Questo carattere si ritrova anche negli ancestrali miopiteci e in specie con atteggiamento in prevalenza terricolo come *dryas*, *hamlyni*, *lomamiensis* e *neglectus* (Groves, 2001; Gautier et al., 2002; Butynski et al., 2013) e la papionina *Mandrillus sphinx* (Bagnara et al., 2007), ad indicarne la probabile presenza in un antenato comune semi-terricolo e la sua posteriore sostituzione con una vivace colorazione frontale nei cercopiteci maggiormente arboricoli (Kingdon, 1988b).

Pur non presentando gli adattamenti cursori di EPA, anche al gruppo *aethiops* sono state attribuite abitudini terricole (Fleagle, 1998; Butynski, 2002; Gautier et al., 2002; Xing et al., 2007; Cardini & Elton, 2008a; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Haus et al., 2013; Gilbert et al., 2014): rispetto agli eritrocebi, però, gli arti dei clorocebi non sono altrettanto specializzati e si presentano come un mosaico di caratteri arboricoli e terricoli, in cui gli adattamenti successivi si sono aggiunti ai precedenti (Kingdon, 1988a; Cardini & Elton, 2008a; Sineo, 2012a). Analizzando i fossili dei primati miocenici, è stato osservato come i loro

adattamenti locomotori ricordino quelli dei clorocebi attuali, indizio della grande capacità che i primati già possedevano di esplorare un ampio spettro di risorse (Benefit, 1999). I clorocebi, infatti, hanno un'ampia diffusione sul continente africano: si ritrovano in quasi tutta l'Africa sub-sahariana fino alla provincia del Capo (Fig. 3), in una varietà di habitat non confrontabile con quella degli altri Cercopithecini (Rowe et al., 1996; Fleagle, 1998; Cardini et al., 2007; Kamilar et al., 2009).

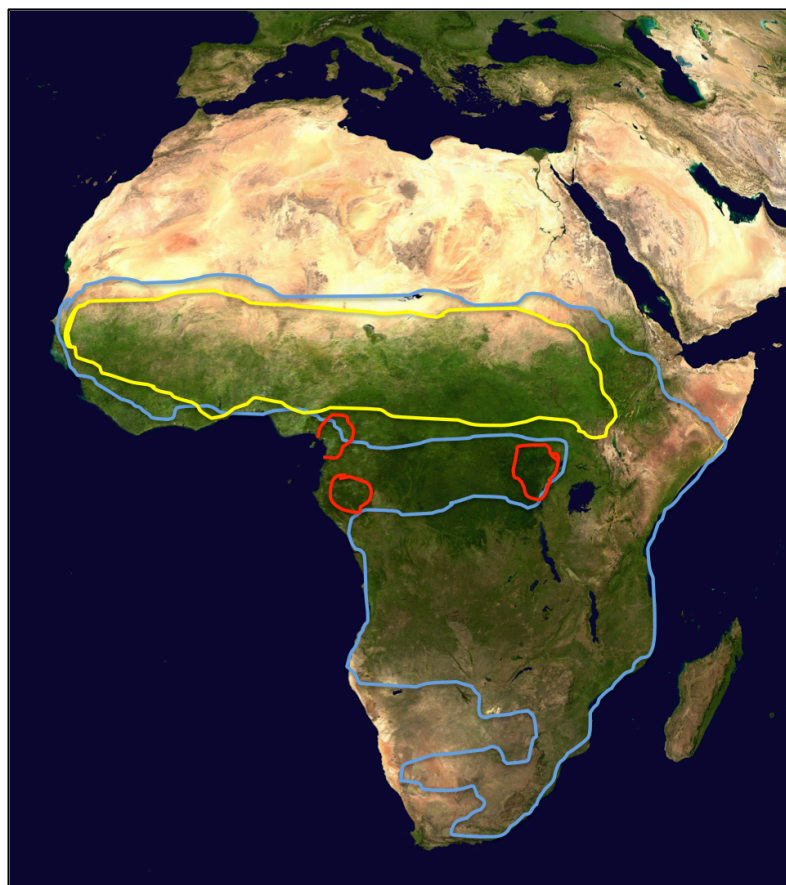


Figura 3. Distribuzione dei generi *Erythrocebus* (giallo), *Chlorocebus* (azzurro) e *Allochocebus* (rosso) (Hill, 1966; Heads, 2011).

Benché Groves (2001) tenda a riconoscere sei specie distinte all'interno del taxon, anche in ragione dell'ampia distribuzione del gruppo, le somiglianze morfologiche e l'uniformità cariotipica ($2n = 60$) (Sineo et al., 1986; Moulin et al., 2008) rimangono motivo di dibattito tassonomico (Grubb et al., 2003; Haus et al., 2013). Fenotipicamente, esibiscono il corpo di colore verde-brunastro e la faccia nera contornata da ciuffi bianchi (Butynski et al., 2013); cromosomicamente, si presentano altamente conservativi nel numero e nei pattern di bandeggio (Sineo et al., 1986; Moulin et al., 2008), somigliando maggiormente alle papionine che ai loro parenti cercopiteci (Ponsà et al., 1981; Stanyon & Sineo, 1983). Inoltre, la morfometria cranica e mandibolare non differisce in maniera sostanziale da quella del genere

Cercopithecus (Lo Bianco et al., *submitted*). Non è stato ancora chiarito se i diversi taxa rappresentino unicamente delle varianti geografiche (Cardini et al., 2007) e vadano, pertanto, mantenute (o abbassate) al rango di sottospecie (Grubb et al., 2003). Tuttavia, che abbiano raggiunto o meno un livello di divergenza tale per cui possano essere considerate specie distinte, le diverse forme esistenti sembrano discendere tutte da un antenato comune comparso nel Miocene superiore, presumibilmente nell’Africa centroccidentale, come ipotizzato per i restanti membri della tribù (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013). Infatti, osservandone il pattern di distribuzione, si nota come non si ritrovino nei deserti e nel bacino del Congo (Rowe et al., 1996; Groves, 2001; Cardini et al., 2007): lo scenario più plausibile prevede che abbiano colonizzato il versante orientale del continente in un secondo momento, muovendosi in direzione NE attorno al bacino del Congo (Guschanski et al., 2013). I diversi ambienti lungo il Rift centrale e l’insorgenza delle alture lungo l’Albertine Rift a est, durante il Neogene (da 23 ma), possono essere stati responsabili di un precoce differenziamento orientale (Grubb et al., 1999): ben quattro (sotto)specie, infatti, sono presenti nella porzione Est del continente (Groves, 2001; Butynski et al., 2013). In seguito, quando gli habitat si sono rivelati favorevoli, potrebbero aver colonizzato l’Africa del Sud: è stato appurato che, nel Plio-Pleistocene, tra la porzione nord-orientale e quella meridionale non vi fosse continuità nella distribuzione degli habitat forestali (Grubb et al., 1999; Benefit, 1999), fattore che potrebbe aver rappresentato una barriera geografica all’espansione di alcune specie (Benefit, 1999), ma probabilmente non dei clorocebi, adattati anche agli ambienti aridi (Rowe et al., 1996). Gli eritrocebi, invece, più limitati nella scelta dell’habitat, sono rimasti confinati alla porzione boreale del continente, di cui hanno colonizzato una fascia compresa tra il Sahara e l’equatore (Rowe et al., 1996) che ricalca quasi perfettamente quella occupata da alcuni membri del gruppo *aethiops* (Fig. 3). L’ampia sovrapposizione dell’areale subtropicale mostrata, commisurata al breve tempo stimato per la loro divergenza, potrebbe indurre a pensare che siano andati incontro ad un fenomeno di speciazione simpatica (Kamilar et al., 2009). Tuttavia, si ritiene che l’evoluzione della tribù dei Cercopithecini sia proceduta per ripetuti eventi di speciazione allopatrica (Kamilar et al., 2009; Heads, 2011; Guschanski et al., 2013); pertanto, è probabile che, nel caso del genere *Erythrocebus* e del taxon *aethiops*, l’elevata abilità dispersiva delle specie coinvolte abbia mascherato la loro reale storia evolutiva (Kamilar et al., 2009). Storia che prevede una speciazione basale e rapida e la permanenza di caratteristiche comuni che hanno portato taluni autori a considerarle parte di un unico clade (Heads, 2011): entrambe presentano attitudini terricole, colorazione perineale bluastra, complessità delle vocalizzazioni, ridotto *reshuffling* genomico, assenza di sei fissioni cromosomiche riscontrabili in alcuni cercopiteci

s.s. (Grubb et al., 2003), ma presenza di tre punti di rottura in corrispondenza dei cromosomi HSA6, 7 e 15 (Stanyon et al., 2004) e inserzioni comuni nella sequenza del gene TSPY (Tosi et al., 2003). Tuttavia, queste caratteristiche da sole non giustificano la creazione di un clade né tantomeno bastano per elevare il taxon *aethiops* al rango di genere. Esse, infatti, potrebbero scaturire da fenomeni di convergenza evolutiva o essere rimaste come retaggio di un'origine comune. La quasi totalità di queste caratteristiche sono condivise anche dal gruppo *lhoesti* che, difatti, ne viene considerato il *sister taxon* (Gautier et al., 2002; Heads, 2011). Le specie che taluni vi riconoscono (*lhoesti*, *preussi* e *solatus*) presentano pattern fenotipici molto simili, display visivi basati sulla posizione della coda (Gautier et al., 2002) e caratteri morfologici a mosaico – come nella specie *aethiops* – indicanti un'attitudine sia alla vita a terra che tra gli alberi (Kaplin, 2002; Sineo, 2012a; Butynski et al., 2013). Ciononostante, pur essendo caratterizzate tutte e tre dallo stesso numero diploide ($2n = 60$) (Romagno, 2001), *lhoesti* e *preussi* presentano un cariotipo identico su base molecolare (Moulin et al., 2008), mentre *solatus* differisce per tre riarrangiamenti cromosomici (Gautier, 1988). Rispetto al genere *Cercopithecus*, in cui vengono comunemente inserite (Grubb et al., 2003), ma in comune con le specie *patas* ed *aethiops*, hanno abitudini alimentari da animali terricoli, nutrendosi prevalentemente di erbe rinvenute sul terreno (Kaplin, 2002). Viceversa, in comune con i cercopiteci e a differenza di eritrocebi e clorocebi, vivono in habitat forestali di montagna e di pianura (Rowe et al., 1996; Butynski et al., 2013): *lhoesti* occupa un'area compresa tra Congo, Uganda e Ruanda, sulla riva orientale del fiume Congo; *preussi* e *solatus* si trovano unicamente sul versante occidentale del bacino, rispettivamente in Camerun e in Gabon (Gautier et al., 2002; Kaplin, 2002; Tosi, 2008) (Fig. 3). Nonostante la distribuzione delle specie *preussi* e *solatus* sia geograficamente più vicina, geneticamente il *sister taxon* di *preussi* è *lhoesti* (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013), associazione supportata dai risultati citogenetici ma non da quelli acustici (Gautier, 1988). Per spiegare una situazione all'apparenza paradossale, è stato ipotizzato che le popolazioni fossero inizialmente in contatto (Kaplin, 2002) e che, in seguito, barriere più forti e durature tra il Camerun e il Gabon – piuttosto che tra il Camerun e il Congo – siano entrate in gioco (Gautier et al., 2002). La comparsa delle specie del gruppo *lhoesti* intorno ai 7 ma colloca molto presto tale insorgenza (Guschanski et al., 2013). La stessa distribuzione caratterizza anche il genere *Gorilla*, le cui specie si trovano ai due estremi longitudinali del bacino (Heads, 2011), ad indicare una simile storia evolutiva. È stato ipotizzato un probabile evento ancestrale di dispersione da ovest verso est lungo la “Northern Migratory Track”, un corridoio ad alta quota al di sopra dei confini del bacino (Tosi, 2008; Guschanski et al., 2013): tale percorso richiama quello probabilmente intrapreso

da *patas* ed *aethiops* nel loro movimento dispersivo verso oriente (Guschanski et al., 2013). Il riconoscimento di uno stesso pattern di dispersione in taxa diversi potrebbe indicare uno o più eventi di speciazione successivi alla dispersione stessa. In alternativa, le specie precedentemente separatesi, potrebbero aver sperimentato analoghe pressioni ecologiche, distribuendosi in maniera coerente. Gli areali dei tre presunti generi, infatti, appaiono vicarianti (Hedges, 2011). Se si aggiunge, nel quadro biogeografico, anche la distribuzione di *A. nigroviridis* (ANI), la specie ritenuta maggiormente imparentata (Perelman et al., 2011), i loro areali mostrano una distribuzione allopatica (Hedges, 2011). Tuttavia, tali pattern di distribuzione sembrano frutto più di circostanze ecologiche che filogenetiche. Il bacino del Congo, infatti, deve aver rappresentato una barriera alla dispersione per queste specie (Guschanski et al., 2013), in aggiunta ad altri fenomeni di natura geologica o climatica (Oates, 1988), come ad esempio, l'interruzione della *Northern Migratory track*, l'isolamento in rifugi forestali (*lhoesti*) o la colonizzazione di ambienti più aridi (*patas*). L'unione cladistica tra i gruppi *patas*, *aethiops* e *lhoesti* appare basata principalmente su simili attitudini ecologiche. Inoltre, le similitudini morfometriche tra le specie del genere *Cercopithecus* e i gruppi *aethiops* e *lhoesti* portano a credere che questi ultimi non rappresentino generi indipendenti (Lo Bianco et al., *submitted*).

1.7 Il genere *Cercopithecus* e i suoi “species groups”

Come già riportato, nell'intervallo tra i 7,4 e i 6,8 ma, Guschanski et al. (2013) datano anche la comparsa degli *species groups* del genere *Cercopithecus*; per Disotell & Raaum (2002) tale comparsa va anticipata all'intorno 8,5-7,5, mentre per Perelman et al. (2011) il primo gruppo non appare anteriormente ai 6,16 ma (Tab. 3); altre filogenesi riportano valori ancora più recenti (Tosi et al., 2005; Hart et al., 2012; Butynski et al., 2013). Il gap tra le cronologie potrebbe testimoniare ancestrali fenomeni di introgressione di materiale genomico solamente maschile tra le popolazioni (Tosi et al., 2004; Guschanski et al., 2013) o, semplicemente, essere dovuto a differenze nelle tecniche (Disotell & Raaum, 2002) e nei marcatori utilizzati. Tuttavia, è sicuramente indice del basso livello di risoluzione che si ottiene man mano che si riduce il rango tassonomico.

Il periodo individuato ricade all'interno di una fase di profonde trasformazioni climatico-vegetazionali che investono l'Africa tropicale: tra i 10,5 e i 7,5 ma, sul versante occidentale del continente, una minima copertura boschiva si contende lo spazio disponibile con la savana; a partire dai 7,5 ma solamente fino ai 7 ma, si assiste ad una “fase forestale”, caratterizzata da

una generale abbondanza di taxa arborei; dai 7 ai 5,5 ma, un trend globale di riscaldamento comporta l'avanzamento degli ambienti praticolo-boschivi, con un picco di aridità tra i 6,5 e i 6 ma in cui l'estensione forestale è ai suoi minimi (Maley, 1996; Bonnefille, 2010). È a questo periodo, difatti, che si fanno risalire l'inizio della desertificazione del Sahara (Maley, 1996) e la crisi di salinità del Messiniano. In seguito, un nuovo aumento della superficie boschiva contraddistinguerà il confine Miocene-Pliocene, circa 5,5 ma (Bonnefille, 2010).

Anche per il genere *Cercopithecus*, dunque, potrebbe essere ammessa un'origine miocenica semi-terricola in ambienti aperti e aridi e una radiazione interna – cospicua ma pleistocenica – confinata alle foreste equatoriali (Pickford & Senut, 1988; Tosi et al., 2005; Butynski et al., 2013). Considerando la preferenza per gli ambienti forestali mostrata dai cercopiteci attuali (Rowe et al., 1996; Guschanski et al., 2013) e la condizione derivata degli arti di alcune specie arboricole (Kingdon, 1988a), è possibile che gran parte della speciazione all'interno del genere sia avvenuta in un periodo di massima distribuzione dei taxa arborei. Il genere *Cercopithecus*, infatti, è considerato il ramo arboricolo di una precoce radiazione interna alla tribù (Dutrillaux et al., 1988; Butynski et al., 2013) (Fig. 4).



Figura 4. In azzurro, distribuzione degli *species groups* del genere *Cercopithecus*, ad eccezione del gruppo *mitis* (linea gialla) (Hill, 1966; Heads, 2011).

La specie ritenuta ancestrale e *sister taxon* di tutte le altre, però, non è prettamente arboricola: *C. dryas* (CDR), unico membro del gruppo *dryas*, spende gran parte del tempo tra il suolo e i livelli più bassi degli alberi alla ricerca di nutrimento, come avviene in *lhoesti* (Butynski et al., 2013) che Dutrillaux et al. (1988) consideravano la specie più ancestrale. Tuttavia, CDR è stata così limitatamente studiata che si sa veramente poco delle sue caratteristiche e della sua relazione con le altre specie del genere. Dal punto di vista fenotipico, la piccola taglia lo accomuna con gli ancestrali miopiteci (Butynski et al., 2013), mentre la morfologia cranio-dentale e i pattern di colorazione facciale e genitale ricordano maggiormente la specie *aethiops* (Tosi et al., 2005; Guschanski et al., 2013). Sono state riscontrate delle affinità nel colore del mantello con *C. diana* (Hill, 1966; Tosi et al., 2005; Butynski et al., 2013) e nelle differenze tra giovani e adulti con *C. neglectus* (Groves, 2001; Butynski et al., 2013). Non si hanno informazioni sul numero cariotipico, ma – in linea con le specie considerate simili – è possibile che sia caratterizzata da un valore medio, tra il 54 di *talapoin* e il 62 di *neglectus* (Groves, 2001; O'Brien et al., 2006). Sulla base della ridotta distribuzione attuale all'interno del bacino del Congo, nelle aree paludose caratteristiche dell'habitat di *nigroviridis*, l'ipotesi di una distribuzione relittuale sembra avvalorata. Tuttavia, tale opzione non trova riscontro nell'odierno areale delle specie con cui gli autori citati trovano affinità. L'unico areale che si sovrappone è quello di *neglectus*, nel cuore dell'Africa centrale (Rowe et al., 1996). Tuttavia, si ritiene che *C. neglectus* si sia evoluta intorno ai 5 ma (Perelman et al., 2011), quando gli ambienti forestali e paludosi dominavano lo scenario equatoriale (Butynski et al., 2013). Inoltre, dal punto di vista citogenetico, *neglectus* non mostra affinità con i potenziali *sister taxa* di CDR, collocandosi in posizione basale al ramo che porterà al gruppo *mona* (Stanyon et al., 2004). Benché le relazioni filogenetiche con le altre specie restino poco chiare, non sembrano esserci dubbi sull'inserimento di *dryas* all'interno del genere *Cercopithecus* (Benefit, 1999; Butynski et al., 2013). Perelman et al. (2011), non considerando *dryas* nelle loro analisi, collocano il gruppo *hamlyni* in posizione basale, ritenendolo il primo lignaggio di cercopiteci s.s. a speciare intorno ai ~6 ma; Guschanski et al. (2013), pur inserendo CDR nell'analisi, pongono comunque *hamlyni* tra le specie ancestrali (~7 ma), più vicina ai clorocebi che ai suoi parenti cercopiteci; in aperta contraddizione con queste informazioni ottenute dalle analisi genetiche, lo studio del repertorio acustico riporta una parentela di *hamlyni* con *neglectus* (Gautier, 1988), mentre studi molecolari e biogeografici riconoscono una stretta vicinanza col gruppo *mitis* (Butynski et al., 2013). Similitudini nella conformazione ossea e nella colorazione del mantello e dei genitali (Groves, 2001; Butynski et al., 2013), nonché nel comportamento delle proteine ematiche (Ruvolo, 1988) e nei pattern di

distribuzione lo associano a *lhoesti* (ALH). I due taxa, inoltre, presentano una distribuzione comune tra i fiumi Lindi e Lualaba nel Congo orientale (Butynski et al., 2013), relittuale come quella di *nigroviridis* e simpatica con quella di *neglectus* (CNE) e *mitis*. Per contro, la sovrapposizione di areale potrebbe aver contaminato la storia evolutiva con fenomeni di convergenza e/o evoluzione reticolata (Perelman et al., 2011). Piuttosto che con ALH e CNE, infatti, *hamlyni* condivide la presenza delle sei fissioni cromosomiche assenti in *patas* e *aethiops* con le specie *diana*, *mona*, *cephus* e *nictitans*: tali sinapomorfie supportano il loro inserimento all'interno di un clade monofiletico (Grubb et al., 2003). Quest'ultimo – e complessivamente tutto il genere *Cercopithecus* –, sarebbe andato incontro ad una rapida speciazione iniziale (Xing et al., 2007) che giustificherebbe la precoce separazione di *hamlyni* dal resto dei taxa e la presenza, unicamente nel suo cariotipo, di specifiche traslocazioni (Moulin et al., 2008). La recente scoperta della specie *C. lomamiensis*, il cui nome deriva dall'areale delimitato dal corso dei fiumi Lomami e Tshuapa (Hart et al., 2012), ha reso bi-specifico il gruppo *hamlyni*, ma non è servita a chiarire i rapporti filogenetici con le altre specie.

Pressoché nello stesso periodo, altri lignaggi fanno la loro comparsa – i gruppi *diana*, *mona*, *cephus* e *mitis* (Guschanski et al., 2013) –, distinguendosi relativamente presto dall'ancestrale cercopiteco e distribuendosi ai due lati del continente. La comparsa quasi contemporanea di taxa caratterizzati da numeri diploidi estremamente variabili ($2n = 58$ in *diana* e 72 in *mitis*; Romagno, 2001) contrasta con la teoria dell'aumento lineare del numero cromosomico, che non risulta quindi una tendenza vera e propria (Sineo, 1986; Stanyon et al., 2011). Inoltre, i riarrangiamenti cromosomici mostrati non seguono un andamento uniforme e dicotomico, forse a causa di ancestrali pattern polimorfici o di eventi di ibridazione (Kamilar et al., 2009): ciò contribuisce a confondere il processo di ricostruzione filogenetica. In aggiunta, l'incertezza nel collocare le specie più ancestrali del genere condiziona il posizionamento di tutte le altre. Quasi tutti gli studi sono concordi nel riconoscere la precoce radiazione del gruppo *diana* e nel collocarlo in un unico clade con *neglectus* e con il gruppo *mona* (Tosi et al., 2004; Tosi et al., 2005; McGoogan et al., 2007; Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013); all'incirca contemporanea risulta la divergenza del clade *mitis/cephus* (Disotell & Raaum, 2002; Tosi et al., 2004; Tosi et al., 2005; McGoogan et al., 2007; Xing et al., 2007; Moulin et al., 2008; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013). Il supporto a questi due cladi deriva dagli alti valori di bootstrap degli alberi filogenetici, dal grande numero di mutazioni sinapomorfiche riscontrate e dalla quantità di delezioni condivise tra le specie (Tosi et al., 2005). Tuttavia, basandosi unicamente su informazioni ricavate dalle analisi

molecolari o dalla citogenetica, si corre il rischio di sottostimare l'importanza degli aspetti biologico-ecologici. Tali aspetti, però, nel caso degli *species groups* del genere *Cercopithecus* non si mostrano risolutivi. La clusterizzazione dei cladi *diana/neglectus/mona* e *mitis/cephus* è parzialmente sostenuta dagli studi sulle vocalizzazioni: *nigroviridis* si colloca alla base della tribù e *diana* rappresenta il ramo precoce del clade “forestale”, al cui interno, *hamlyni* in una posizione intermedia ma non ben definita distingue il raggruppamento *neglectus/mona* da quello *nictitans/cephus* (Gautier, 1988). Dal punto di vista fenotipico, le specie mostrano pattern di colorazione gruppo-specifici, con qualche punto in comune tra membri di uno stesso clade: una mascherina nera caratterizza il contorno occhi delle mona, ma la colorazione frontale sui toni del giallo-arancio richiama vagamente quella di *neglectus* (Groves, 2001; Butynski et al., 2013); nel muso delle diana dominano il bianco e il nero ma, come le mona, esibiscono il dorso rossastro; le specie del gruppo *cephus* mostrano pattern facciali unici ed estremamente vivaci, con toni variabili dal giallo al rosso e al blu; tuttavia, *ascanius* e *petaurista* condividono con *nictitans* la colorazione del naso di un bianco brillante (*spot-nosed monkeys*) (Grubb et al., 2003). La taglia non rappresenta un elemento discriminante, poiché tra i 3-6 kg delle diana e i 3-5 kg delle *cephus* la differenza è irrilevante; l'unica eccezione è rappresentata dai maschi del gruppo *mitis* che possono arrivare anche ai 12 kg (Rowe et al., 1996; Butynski et al., 2013), suggerendo un posteriore trend di accrescimento. Nemmeno dal numero cromosomico si evince una distinzione tra cladi, per la variabilità intra- e inter-gruppo non coerente (gruppo *mona* = 66 in *campbelli*, 68 in *mona* e 72 in *pogonias*; gruppo *mitis* = 70 in *nictitans* e 72 in *mitis* e *albogularis*) (Sineo, 1990; O'Brien et al., 2006; Moulin et al., 2008). I valori più bassi di *campbelli* e *nictitans*, nei riguardi dei gruppi di appartenenza, sono stati interpretati come indizio di ancestralità (Butynski et al., 2013), tuttavia ciò non emerge dagli alberi filogenetici (McGoogan et al., 2007; Guschanski et al., 2013). Nonostante questa variabilità, la monofilia del gruppo *mitis* risulta confermata (Disotell & Raaum, 2002; Tosi et al., 2004; Tosi et al., 2005; Moulin et al., 2008), a differenza di quella del gruppo *cephus* (Tosi et al., 2005; Moulin et al., 2008), caratterizzato invece da omogeneità cromosomica ($2n = 66$; Romagno, 2001). I pattern di dispersione, pur apparendo in alcuni casi gruppo-specifici (Guschanski et al., 2013), non aiutano nell'interpretazione delle relazioni tra *species groups*: le diana si trovano esclusivamente sul versante occidentale del continente, tra la Sierra Leone e il Ghana; le *cephus* e *mona* hanno entrambe una distribuzione centroccidentale, disponendosi dal Senegal all'Uganda; per *neglectus* si parla di distribuzione centrale, dal momento che occupa gran parte del bacino del Congo; al contrario, le *mitis* – le più diffuse del genere – si ritrovano in buona parte della fascia tropicale, scendendo fino alla regione del Capo (Rowe et al., 1996;

Groves, 2001). Tuttavia, l'analisi delle distribuzioni attuali documenta un'estesa sovrapposizione di areale (Lambert, 2002): *diana* e *roloway* risultano simpatriche con il gruppo *mona*, all'interno di un'area considerata centro di speciazione (Colyn, 1991); anche *nictitans* e alcune specie del gruppo *cephus* condividono la medesima porzione di continente delle diana, dimostrando una probabile ripartizione della copertura forestale (Fleagle, 1998). Allo stesso modo, l'areale delle *cephus* e *mitis* si sovrappone dal versante occidentale fino al bacino del Congo, benché le *mitis* abbiano una distribuzione nettamente più vasta (Rowe et al., 1996; Groves, 2001). Nonostante la coesistenza appaia molto numerosa, sembra che la capacità portante degli ambienti in cui vivono queste specie sia limitata ad un massimo di 4-6 cercopiteci contemporaneamente (Hamilton, 1988).

1.8 L'evoluzione nei rifugi pleistocenici e la distribuzione attuale

L'attuale distribuzione geografica dei Cercopithecini, molto probabilmente, non corrisponde a quella miocenica e lo stesso si può dire per i pattern di vegetazione. Se fino ai 5,5 ma il continente africano era stato soggetto a fenomeni di inaridimento globale, tra il confine Miocene-Pliocene e il tardo Pliocene (5,5 - 3,5 ma) un nuovo stravolgimento interessa il clima dell'Africa equatoriale, coinvolgendo in particolar modo le precipitazioni: le foreste tornano ad ampliare la loro distribuzione, a discapito dei più aperti ambienti boschivi, con la conseguente diffusione dei taxa forestali su tutta la fascia centrafricana (Bonnefille, 2010). Per alcuni autori, questo periodo non corrisponde a nessun particolare evento speciativo nella tribù dei Cercopithecini (Guschanski et al., 2013); per altri, al contrario, il Pliocene inferiore vede la comparsa di numerose specie (Tosi et al., 2005; Perelman et al., 2011; Hart et al., 2012). È altamente probabile che un nuovo ampliamento della copertura forestale abbia condizionato l'evoluzione dei Cercopithecini, se non in termini numerici di comparsa di nuove specie, quantomeno come diffusione sul territorio africano: infatti, poiché la maggiore variabilità si osserva all'interno del genere *Cercopithecus* (Glenn & Cords, 2004), in cui la quasi totalità delle specie è legata ad ambienti forestali (Fleagle, 1998; Ukizintambara & Thébaud, 2002; Kamilar et al., 2009; Guschanski et al., 2013), la speciazione in sé e per sé sembra essere stata guidata da frammentazione nella distribuzione delle foreste (Rowe et al., 1996; Tosi, 2008; Kamilar et al., 2009; Guschanski et al., 2013). Tuttavia, il declino della superficie forestale non dev'essere visto come un deterioramento progressivo e inarrestabile verso gli ambienti di savana, perché negli ultimi milioni di anni vi sono stati numerosi cicli di contrazione ed ampliamento degli ecosistemi vegetazionali, con picchi di espansione delle foreste alternati a

periodi dominati da ambienti aperti e aridi (Maley, 1996; Kaplin, 2002; deMenocal, 2004; Bonnefille, 2010) (Fig. 5).

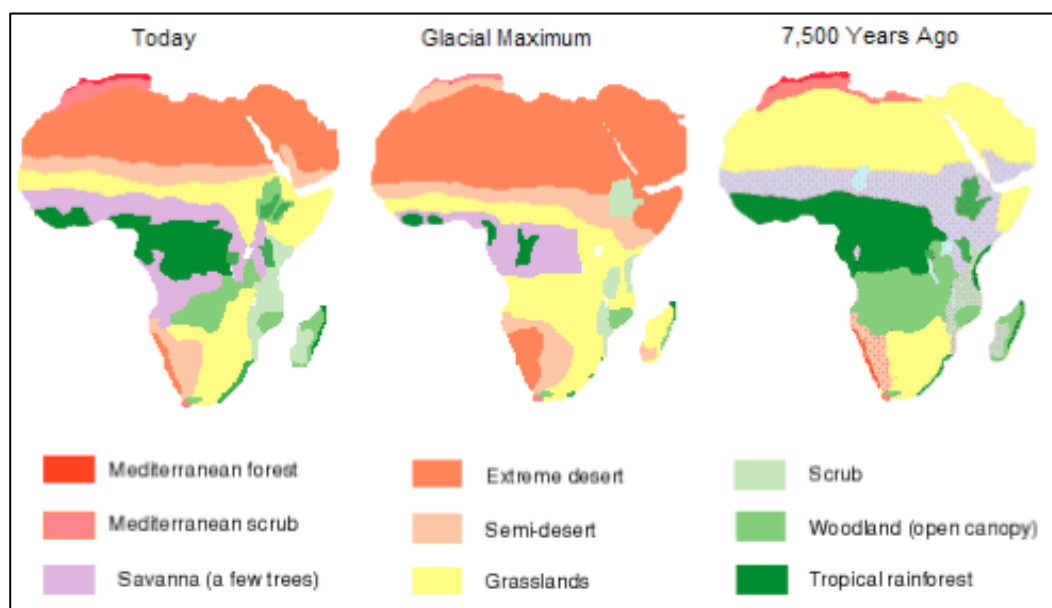


Figura 5. Distribuzione della vegetazione sul continente africano in tre differenti periodi (da Adams & Faure, 1997).

Tale alternanza comincia approssimativamente intorno ai 3,5 ma, nel tardo Pliocene e dura fino ai 2,7 ma, nel passaggio tra Pliocene e Pleistocene, quando l'ampliamento della calotta polare artica orienta il clima verso un periodo glaciale (deMenocal, 2004; Bonnefille, 2010): ciò segna l'inizio dell'era glaciale del Quaternario (Hamilton, 1988). Complice la definitiva chiusura dell'istmo di Panama che altera la circolazione sottomarina, la prima fase della "Northern Hemisphere Glaciation" causa l'espansione delle praterie e il conseguente ritiro delle foreste (Maley, 1996; deMenocal, 2004), le quali cominciano ad assumere approssimativamente l'aspetto odierno (Bonnefille, 2010) (Fig. 5). Tali modifiche vegetazionali devono aver inciso alquanto nella successiva evoluzione dei Cercopithecini (Rowe et al., 1996; Ukizintambara & Thébaud, 2002; Tosi, 2008; Kamilar et al., 2009; Guschanski et al., 2013), le cui popolazioni si sono ritrovate isolate le une dalle altre nei rifugi rimasti lungo la fascia equatoriale (Hamilton, 1988; Oates, 1988; Guschanski et al., 2013; Kawamoto et al., 2013). Tra questi, i più importanti sono stati localizzati lungo i fiumi, principalmente il Congo (Grubb et al., 1999; Kaplin, 2002; Eriksson et al., 2004) e sugli altipiani in Liberia, Camerun e Uganda (Hamilton, 1988; Grubb et al., 1999) (Fig. 6).

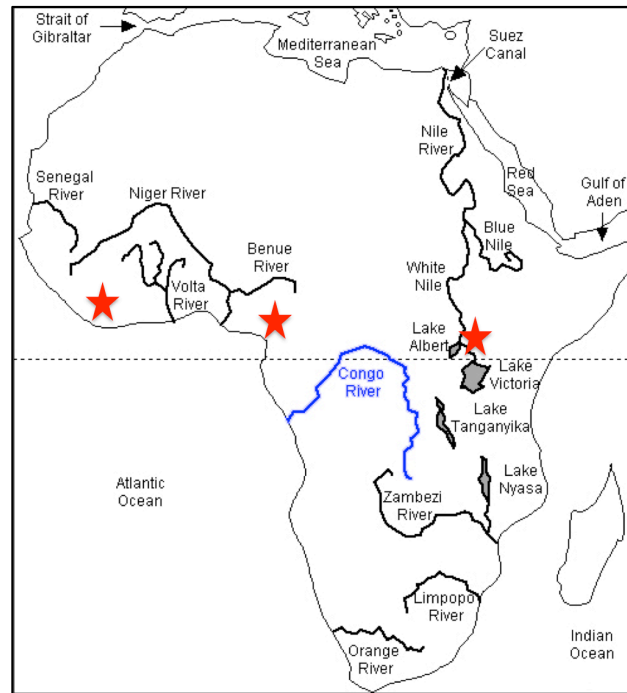


Figura 6. Localizzazione dei rifugi pleistocenici lungo gli altipiani (stelle rosse) e i corsi dei fiumi (tratti neri e blu).

L'isolamento forzato può aver indirizzato le specie verso cammini differenti, favorendo la comparsa di entità specifiche distinte. La maggior parte dei cercopiteci, infatti, comprende primati arboricoli di piccolo-medie dimensioni (Hill, 1966; Fleagle, 1998; Groves, 2001) dalle limitate capacità dispersive (Kamilar et al., 2009). Sembra che, nel Pleistocene, la percentuale di cercopiteci in Africa orientale non superasse l'1% del totale dei primati (Benefit, 1999), nonostante i fossili testimoniano un picco nel numero di cercopitecidi (Bobé et al., 2002). Il gap, però, potrebbe anche essere dovuto al fatto che la maggior parte delle specie sono diffuse in habitat forestali, generalmente non oggetto di indagini paleontologiche (Leakey, 1988).

L'evoluzione nei rifugi Pleistocenici è stata più volte proposta per i primati africani (Guschanski et al., 2013; Kawamoto et al., 2013) e, nel caso dei Cercopithecini, potrebbe effettivamente aver condizionato parte della loro evoluzione. Ciò confermerebbe la datazione mitocondriale individuata per la speciazione all'interno degli *species groups* tra i 2,4 e i 2,1 ma (Guschanski et al., 2013). Tuttavia, altri studi datano la speciazione all'interno dei generi in un intervallo temporale precedente, tra i 5,5 – 4,5 (Hart et al., 2012) e i 4,8 – 4,6 (Tosi et al., 2005) (Pliocene Inferiore). In questo comunque breve lasso di tempo, sarebbero comparsi i numerosi e diversi cercopiteci s.s. che osserviamo oggi, in uno scenario ecologico non così distante dall'attuale (Bonnefille, 2010) (Fig. 5).

Le porzioni di continente in cui si riscontrano le più ampie sovrapposizioni sono quelle ritenute maggiormente coinvolte negli episodi di speciazione: analizzando come si distribuiscono le diverse specie, una grande abbondanza si osserva nell'Africa

centroccidentale, tra la Sierra Leone e il Ghana, la Nigeria e il Gabon e all'interno del bacino del Congo, fino all'Uganda (Maley, 1996; Heads, 2011). A queste aree corrispondono quelle che Colyn (1991) considerava i principali centri di speciazione per i primati africani: 1) Liberia – Ovest Nigeria; 2) Est Nigeria – Gabon e 3) Est/Sud Congo. La separazione tra la prima e la seconda area è costituita dal fiume Niger in Nigeria; tra la seconda e la terza, invece, il confine è rappresentato dal corso del fiume Congo. Inoltre, tali aree corrispondono anche a quelle che presumibilmente hanno agito, insieme ai bacini fluviali, da rifugi durante i periodi freddi e aridi che si sono succeduti dal Pliocene ad oggi (Hamilton, 1988; Grubb et al., 1999; Kaplin, 2002; Eriksson et al., 2004) (Fig. 6). La prima area e parte della seconda si sovrappongono al vasto sistema di foreste guineane (*Upper e Lower Guinean Forests*), distribuito tra il Senegal e la sponda settentrionale del fiume Sanaga in Camerun; la terza area ricade all'interno dell'ampio bacino del Congo, tra la porzione orientale del Congo-Brazzaville e l'Uganda occidentale. Esse rappresentano i principali hot-spot di tutta l'Africa, per il ruolo che ripetutamente hanno rivestito nel condizionare la diversificazione dei Cercopithecini (Heads, 2011; Guschanski et al., 2013). Le foreste guineane – *Upper e Lower* – sono delimitate a sud dall'oceano Atlantico, a ovest e a nord dall'estensione delle foreste aride (Bonnefille, 2010) e a est dai rilievi del Rift centrale (CARS) e dal fiume Sanaga. All'interno delle foreste si ritrovano ben 12 diverse specie di Cercopithecini (*preussi, diana, roloway, mona, campbelli, lowei, pogonias, petaurista, erythrotis, erythrogaster, sclateri e nictitans*) (Groves, 2001) (Kaplin, 2002; Tosi, 2008; Butynski et al., 2013). Molte di esse presentano distribuzioni simpatriche, fattore che spesso porta alla formazione di associazione polispecifiche e/o alla competizione per le risorse alimentari (Gautier-Hion et al., 1983; Gautier-Hion, 1988; Oates, 1988; Fleagle, 1998; Buzzard, 2006; Butynski et al., 2013; Allen et al., 2014). Tali associazioni si mostrano durature soltanto tra le specie eco-etologicamente correlate (Gautier-Hion, 1988). Delle 12 specie individuate, solamente *nictitans* (CNI) occupa entrambe le prime due aree, distribuendosi con una popolazione in Liberia e le altre tra la Nigeria e il margine settentrionale del fiume Congo: la sua distribuzione appare relittuale, ad indicare probabili modifiche climatico-vegetazionali che ne hanno ridotto l'areale, senza condurre all'evoluzione di specie diverse (Groves, 2001; Butynski et al., 2013), nonostante alcuni vi riconoscano due sottospecie distinte (Butynski et al., 2013) e altri tre (Hill, 1966). L'ipotesi trae forza anche dalla distribuzione allopatrica del suo *sister taxon*, *C. mitis*, separato da un affluente dello Zaire, l'Itimbiri (Groves, 2001; Butynski et al., 2013). La foresta occidentale (*Upper*) è separata dall'orientale (*Lower*) dal *Dahomey gap*, una porzione di territorio compresa tra il Togo e il Benin in cui gli ambienti di savana interrompono la continuità forestale, arrivando

fino alla costa (Butynski et al., 2013): vi si ritrovano, infatti, taxa come *tantalus* e *patas* caratteristici degli ambienti di boscaglia e savana predominanti a nord (Bonnefille, 2010). Pur rappresentando un'interruzione nell'estensione delle foreste, alcuni autori ritengono che questo *gap* non abbia un significato biogeografico, poiché non corrisponde ad alcuno stacco nella distribuzione delle specie (Maley, 1996; Heads, 2011); tuttavia, poiché sembra limitare ad est il *range* di *C. petaurista* e a ovest quello del suo *sister taxon*, *C. erythrogaster* (Hill, 1966), altri lo ritengono un'importante barriera (Oates, 1988; Butynski et al., 2013). Anche *C. lowei* non si ritrova a Est dell'interruzione, tuttavia, nel suo caso, la barriera sembra rappresentata più dal fiume ghanese Volta che dalla savana: ciò è avvalorato dalla distribuzione di *C. mona*, appartenente allo stesso gruppo di specie, disposta tra la riva orientale del fiume e il Camerun (Hill, 1966; Groves, 2001; Butynski et al., 2013). Sulla distribuzione delle diana, invece, non sembra avere effetto dal momento che esse si ritrovano confinate in una porzione della *Upper Forest* ben più arretrata del *Dahomey gap*: essendo fortemente dipendenti dalla continuità della copertura forestale (Hill, 1966; Butynski et al., 2013), tale distribuzione potrebbe essere il risultato dell'antica frammentazione cui sono andati incontro gli habitat arborei come risposta a determinati cambiamenti climatici (Maley, 1996). Non sembra esserci una connessione lineare tra l'ampiezza della barriera e il suo effetto sulla fauna (Maley, 1996), considerando che l'area compresa tra i ridotti fiumi Cross (Nigeria) e Sanaga (Camerun) ha un elevato impatto sulla biodiversità (Oates, 1988; Maley, 1996; Heads, 2011), mentre barriere più imponenti come il Rift centrale o il fiume Niger non necessariamente rappresentano un ostacolo alla dispersione (Butynski et al., 2013).

Le foreste guineane non proseguono oltre la sponda settentrionale del fiume Sanaga, nonostante dal punto di vista biogeografico non sia presente una vera e propria interruzione (Oates, 1988): infatti, la seconda area individuata da Colyn (1991) comincia in Nigeria e prosegue fino alla foresta costiera congolese (*Congolian coastal forest*). Il Sanaga ricade al suo interno, mentre il Niger e il Congo rappresentano i confini, rispettivamente a NO e a SE; longitudinalmente è delimitata a ovest dall'oceano Atlantico e a ENE dagli ambienti di foresta arida e savana (*Congolian forest-savanna mosaic*). Vi si ritrovano, in aggiunta a *nictitans*, altre 5 specie di Cercopithecini: *ogouensis*, *solatus*, *neglectus*, *pogonias* e *cephus* (Rowe et al., 1996; Groves, 2001). Di queste, due (*neglectus* e *pogonias*) si ritrovano anche all'interno del bacino (Rowe et al., 1996; Groves, 2001). La continuità degli ecosistemi rende la prima e la seconda regione analoghe in termini ecologici.

La terza ed ultima area individuata è il bacino del Congo, circondato ad occidente dalla foresta costiera congolese, a nord e a sud dagli ambienti di foresta arida e savana e a est dagli habitat

montuosi dell'Albertine Rift. Al suo interno scorre il fitto sistema di affluenti dell'imponente fiume Congo, coinvolto nella speciazione di numerose popolazioni di primati (Colyn & Deleporte, 2002; Eriksson et al., 2004; Heads, 2011): un gran quantitativo di specie, infatti, si ritrova in questo territorio, tra i più ricchi al mondo per numero di primati ed endemismi (Heads, 2011). Anche il Rift orientale ha condizionato la dispersione della tribù, poiché rappresenta un corridoio che, in direzione nord-sud, intermezza degli ambienti aridi agli ecosistemi forestali occidentali e orientali (Bonnefille, 2010; Heads, 2011). All'interno del bacino gravitano 13 specie: l'unico allenopiteco esistente (ANI), un miopiteco (MTA), *lhoesti*, *cynosuros* e nove cercopiteci s.s. (*dryas*, *hamlyni*, *lomamiensis*, *neglectus*, *pogonias*, *wolffi*, *denti*, *mitis* e *ascanius*) (Rowe et al., 1996; Groves, 2001). La distribuzione di queste specie dimostra come non tutti gli appartenenti alla tribù siano vincolati dai fiumi allo stesso modo, sia per ragioni storiche che adattative: per ANI, MTA e CNE (*neglectus*), dotati di capacità natatorie (Fleagle, 1998; Colyn & Deleporte, 2002), infatti, potrebbero non rappresentare una barriera (Kawamoto et al., 2013); le specie del gruppo *mitis*, invece, distribuendosi tutto intorno al bacino ma non al suo interno, mostrano di subirne la presenza. Questa distribuzione perimetrale richiama quella di *patas* e *aethiops*, il che potrebbe essere indizio di un analogo destino evolutivo. In alternativa, se *mitis* e *hamlyni* fossero realmente imparentate, i confini dell'areale dell'intero gruppo verrebbero allargati fin dentro al bacino (Butynski et al., 2013); analogamente lo stesso destino coinvolgerebbe i clorocebi se nel loro gruppo si inserisse la specie *C. dryas* (Tosi et al., 2005; Guschanski et al., 2013). La distribuzione allopatrica dei taxa di ogni raggruppamento supporta l'ipotesi che essi rappresentino variazioni geografiche, principalmente sulla base del colore della pelliccia (Tosi, 2008; Kamilar et al., 2009). Tuttavia il breve lasso di tempo trascorso dalla comparsa delle singole specie non ha consentito l'acquisizione di differenze talmente sostanziose tra esse da permetterne il corretto inquadramento filogenetico. Inoltre, i cariotipi di alcune coppie di specie (*diana* e *roloway*, *erythrotis* e *erythrogaster*, *ascanius* e *cephus*) e la conformazione cranio-mandibolare dell'intero genere *Cercopithecus* si mostrano identici, suggerendo che la loro speciazione è avvenuta senza modifiche evidenti a livello cromosomico o scheletrico (Moulin et al., 2008; Lo Bianco et al., *submitted*). Tuttavia, dal punto di vista ecologico, esse sono considerate entità distinte (Groves, 2001). La già difficile ricostruzione delle relazioni tra i generi, pertanto, si ripropone anche nell'analisi filogenetica delle specie di cercopiteci. In aggiunta, fenomeni di ibridazione sono stati più volte riportati (Gautier, 1988; Struhsaker et al., 1988; Colyn & Deleporte, 2002; Detwiler, 2002; Disotell & Raaum, 2002; de Jong & Butynski, 2010), ad indicare che la speciazione potrebbe essere ancora in corso (Butynski, 2002; Xing et al., 2007).

Inoltre, la flessibilità di comportamento mostrata principalmente dalle specie forestali, in risposta ad un ambiente complesso e mutevole, potrebbe aver contribuito a ridurre l'efficacia delle barriere riproduttive (Gautier, 1988; Chatterjee et al., 2009; Guschanski et al., 2013). Uno scenario a sostegno dell'ipotesi ibridativa post-speciazione è stato proposto anche per chiarire la presenza di similarità cromosomiche in generi distanti (Kamilar et al., 2009) e l'irrisolta clusterizzazione di alcuni taxa (Tosi et al., 2005).

La durata geologicamente ed evolutivamente breve delle fasi glaciali, inoltre, potrebbe aver interrotto i processi di speciazione iniziati durante i periodi di isolamento causati dalla contrazione delle foreste: dopo un periodo di soli 41000 anni (ka), infatti, la fase glaciale si arresta, lasciando spazio al primo interglaciale che durerà fino a 1,8 ma. Successivamente, il clima continuerà a fluttuare tra periodi freddo-aridi associati alle fasi glaciali e periodi caldo-umidi tipici degli interglaciali, con cicli di 41 o 100ka (deMenocal, 2004). Tale alternanza avrà sicuramente causato notevoli ripercussioni sulla copertura vegetazionale, diminuendone o aumentandone l'estensione (Kaplin, 2002) (Fig. 5) e sulle specie ad essa connesse: infatti, modificando alcuni parametri ambientali, come la quantità di precipitazioni, se ne modifica anche la sua produttività, la quale, a sua volta, influisce sulla variabilità intraspecifica (Cardini et al., 2007). Per alcuni autori, in questi milioni di anni di avvicendamento glaciale-interglaciale, si è concentrata gran parte dell'evoluzione dei Cercopithecini (Leakey, 1988; Butynski, 2002; Tosi et al., 2005), principalmente a livello subspecifico (Guschanski et al., 2013) e nelle specie con attitudini forestali (Gautier-Hion, 1988). Infine, circa 10ka fa, si instaura l'ultimo periodo interglaciale: è l'inizio dell'Olocene, caratterizzato da un *optimum* termico che porterà alla fase di massima espansione delle foreste (Maley, 1996; Colyn & Deleporte, 2002). Si comincia a intravedere lo scenario attuale, contraddistinto da distribuzioni relitte, ampie sovrapposizioni di areale, minacce di natura antropica e probabili fenomeni di ibridazione: tutto ciò – in aggiunta ai risultati diversi ottenuti con tecniche diverse – contribuisce a confondere le ricostruzioni filogenetiche e la comprensione generale dei rapporti tra i membri della tribù, rendendo necessarie nuove ed approfondite indagini.

2. MATERIALI E METODI

Per approcciarsi allo studio dei Cercopithecini, sono state scelte due metodologie: la morfometria geometrica e la citogenetica. La prima tecnica è stata selezionata per l'innovativo apporto delle ricostruzioni tridimensionali agli studi craniometrici (Slice, 2005; Cardini & Elton, 2008a); la seconda scelta, invece, deriva da una lunga tradizione che ha prediletto gli aspetti citogenetici per affrontare l'indagine sulla tribù (Chiarelli, 1968; Stanyon et al., 2004). L'approccio bi-disciplinare si basa sulla convinzione che l'integrazione tra due metodologie possa agevolare l'ottenimento di informazioni esaurienti.

2.1 LA MORFOMETRIA GEOMETRICA

2.1.1 Il cranio

Tra tutti i distretti scheletrici che recano in sé informazioni inerenti allo stile di vita dei loro possessori e che si mostrano maggiormente mutevoli, abbiamo scelto di concentrare la nostra attenzione sul cranio, perché soggetto ad ampia variabilità (Fleagle et al., 2010) e di più facile reperimento nelle collezioni museali. La conformazione ossea, infatti, è strettamente connessa alle abitudini ecologico-comportamentali delle singole specie. Ad esempio, le ossa temporali sono il luogo in cui si attaccano i muscoli masticatori sul cranio (Aiello & Dean, 1990), mentre la posizione e la forma delle orbite e del forame magno variano in risposta alle pressioni ambientali (Luboga & Wood, 1990). Nel caso specifico dei Cercopithecini, numerosi studi hanno tentato di classificare le specie sulla base della loro tendenza ad uno stile di vita prettamente terrestre o arboricolo (Tosi et al., 2004; Guschanski et al., 2013). Tuttavia, l'indagine scheletrica a sostegno della presunta dicotomia tra arboricoli e terricoli non ha trovato pieno riscontro nelle specie attuali, poiché i Cercopithecini sono caratterizzati da una struttura anatomica generalmente uniforme (Fleagle, 1998; Cardini & Elton, 2008a; Butynski et al., 2013) e un gran numero di specie mostra entrambe le tipologie di caratteri (Kingdon, 1988a). Inoltre, anche stabilire quale stile di vita si sia evoluto per primo ha incontrato non poche difficoltà, poiché alcune specie presentano specializzazioni terricole (es.: *Erythrocebus patas*) (Hill, 1966; Fleagle, 1998; Butynski et al., 2013), mentre altre sovrastrutture arboricole (es.: *Miopithecus talapoin*) (Kingdon, 1988a). Pertanto, da soli, i pattern di locomozione non possono essere utilizzati per ricavare informazioni chiare e coerenti sulla tribù. Tuttavia,

considerati i numerosi studi che nel tempo hanno proposto e sostenuto tale ripartizione ecologico-locomotoria (Tosi et al., 2004; Moulin et al., 2008; Guschanski et al., 2013; Ravi et al., 2013), un ulteriore sguardo all'anatomia del taxon potrebbe aggiungere informazioni interessanti alla discussione. Infatti, oltre alle innumerevoli caratteristiche già elencate, i Cercopithecini possono essere distinti dai loro parenti più stretti anche sulla base delle caratteristiche craniche: presentano la faccia poco prognata, evidenziando un ridotto allungamento mascellare; la bocca arrotondata sottolinea la forma a U della mandibola; inoltre, mancano di fosse sottorbitarie e di creste ossee evidenti (Sineo, 1986). Per quanto riguarda i rapporti morfometrici che intercorrono tra generi e specie, sono state proposte delle distinzioni anche all'interno della tribù. Da un lato, è stata evidenziata una variabilità principalmente dimensionale che ha portato alla suddivisione del taxon in quattro raggruppamenti: specie di piccola taglia, specie arboricole medio-piccole, specie sia arboricole che terricole di medio-grandi dimensioni e specie di grande taglia (Cardini & Elton, 2008a); dall'altro, sono stati individuati dei caratteri che hanno portato alla clusterizzazione della tribù in due gruppi sulla base delle attitudini: specie con attitudini prevalentemente terricole caratterizzate da orbite più grandi, distanza inter-orbitale maggiore e molari mesio-distalmente più lunghi e specie prettamente arboricole, dotate di rami mandibolari più alti e lunghezza basicraniale maggiore (Ravi et al., 2013). Verificare la coerenza di queste distinzioni rientra tra gli obiettivi prefissati in questa indagine morfometrica.

2.1.2 La tecnica d'indagine

La morfometria è l'insieme delle analisi quantitative effettuate su un corpo, con riguardo alle sue dimensioni e alla sua forma (Slice, 2005). La morfometria geometrica tridimensionale (3D-GM) è interessata alle proprietà geometriche dei corpi (Cardini, 2013). Si definiscono geometriche quelle proprietà che non cambiano al cambiare della posizione, dell'orientamento e/o delle dimensioni dei corpi: esempi sono i rapporti tra le distanze, gli angoli e i dati inseriti in un sistema di coordinate. L'insieme delle tecniche di acquisizione, processamento e analisi di queste proprietà permette di estrapolare tutte le informazioni geometriche relative alla forma contenute nei dati (Slice, 2005, Cardini, 2013). Dal momento che la GM è interessata a caratteristiche invarianti rispetto alla posizione nello spazio e alle dimensioni degli oggetti, la sua indagine si concentra esclusivamente sulla forma (*shape*) e non tiene in considerazione la taglia (*size*). In tal modo è possibile effettuare confronti anche tra organismi di dimensioni

sensibilmente differenti, purché nel complesso si possa riconoscere una forma comune (Cardini, 2013).

L'analisi morfometrica geometrica è stata portata avanti attraverso l'impiego del Microscribe G2X Digitizer (Immersion Corporation, San Jose, CA, USA) (Marcus et al., 1997). Il Microscribe è un puntatore laser capace di effettuare la ricostruzione 3D degli oggetti: è formato da un corpo fisso che costituisce il punto di riferimento e da un braccio mobile che riporta sul computer le coordinate tridimensionali dei punti scelti nell'indagine; le coordinate dei punti sono calcolate in relazione alla loro distanza dalle coordinate del corpo fisso. Attraverso l'integrazione di tutte le distanze lineari esistenti tra il corpo del puntatore e i singoli punti, viene effettuata la ricostruzione della forma tridimensionale dell'oggetto che si sta analizzando. Trattandosi di rapporti tra le distanze e quindi di proprietà geometriche, la ricostruzione si mostra invariante rispetto alla posizione dell'oggetto e al suo orientamento nello spazio (Cardini, 2013). Nel campo della morfometria geometrica, i punti sugli oggetti prendono il nome di *landmarks* (lmks) e, in relazione alla loro posizione, possono essere distinti in quattro tipologie:

- *Type I*: appartengono a questa categoria i lmks collocati su tessuti sovrapposti, come può esserlo un punto triplo scaturito dall'intersezione di due suture (es.: bregma);
- *Type II*: vi sono inseriti i punti di massima curvatura, i quali solitamente sono associati a funzioni biomeccaniche (es.: zygon);
- *Type III*: all'interno di questo raggruppamento si ritrovano i punti posti agli estremi di specifiche distanze (es.: glabella);
- *Pseudolandmarks*: i punti che ricadono nell'ultima categoria non rappresentano dei veri e propri lmks, quanto piuttosto dei punti intermedi tra un landmark e l'altro; non hanno valenza in sé e per sé, poiché è l'insieme di diversi *pseudolandmarks* a permettere di incrementare le informazioni su una specifica forma e di riportarla con maggiore accuratezza (es.: punti sulla circonferenza della cavità oculare) (Slice, 2005).

Poiché i lmks devono essere collocati in maniera precisa su tutti gli oggetti (Cardini & Elton, 2008a), generalmente vengono scelti in corrispondenza di specifiche strutture anatomiche.

2.1.3 Il protocollo

Chiarite la distinzione tra le tipologie di landmarks e la loro applicazione, si identificano i punti maggiormente utili alla propria indagine, nel numero più esauriente possibile. È consigliabile che il quantitativo di punti sia alto, in modo da essere sicuri di ricostruire

approfonditamente tutte le superfici di interesse. Nella fase di analisi è, comunque, possibile rimuovere quei punti che non dovessero risultare sufficientemente discriminanti, senza dover ricorrere ad un nuovo campionamento.

L'insieme dei landmarks scelti prende il nome di *wireframe* e rappresenta il reticolo di punti che costituisce la ricostruzione tridimensionale vera e propria. Durante tutta la fase di campionamento e per ogni singolo campione, il *wireframe* deve rimanere invariato, sia nel numero di punti che lo costituiscono sia nella sequenza con cui vengono collezionati. Poiché ad ogni lmk corrisponde una tripletta di coordinate, è fondamentale che ci sia una corrispondenza biunivoca tra i due valori; in caso contrario, sarebbe impossibile effettuare confronti tra reperti diversi. Per eseguire una comparazione tra oggetti, infatti, è necessario che ad ogni numero sia associato sempre lo stesso landmark, qualunque sia l'oggetto scelto: questo significa che, ad esempio, il lmk numero 1 corrisponde all'inion e il 2 al lambda per ogni elemento campionato; pertanto, se si vogliono effettuare confronti sulla base della distanza inion – lambda, per ogni campione si terrà conto solamente dei valori 1 e 2.

Ciò potrebbe rappresentare un problema nel caso di reperti danneggiati, in cui una o più porzioni non sono presenti: mancando la struttura, infatti, anche i punti corrispondenti mancheranno (*missing landmarks*). In fase di campionamento si lascia uno spazio vuoto nell'elenco delle coordinate, mentre in fase di analisi si ridisegna il network escludendo i punti maggiormente assenti oppure rimuovendo i campioni danneggiati dal totale (Cardini et al., 2007). Infatti, soltanto pochi software sono capaci di leggere i file incompleti (Klingenberg, 2013). Poiché sia per i crani che per le mandibole si assume la simmetria bilaterale, il *wireframe* è stato disegnato limitandosi alle loro emi-porzioni sinistre (lato scelto per convenzione): tale assunzione non inficia la valenza dell'analisi dal punto di vista evolutivo (Cardini & Elton, 2009). Il campionamento unilaterale offre diversi vantaggi: è economico in termini di tempo poiché permette di caratterizzare meglio le singole superfici (Viscosi & Cardini, 2011), senza dover ricorrere ad un numero spropositato e ridondante di punti (Cardini et al., 2007); inoltre, è più semplice, in quanto consente il raggiungimento di ogni porzione ossea selezionata senza dover muovere il reperto. Tutti i punti, pertanto, sono stati considerati sulla metà sinistra dei campioni, ad eccezione di quelli posti sulla loro linea mediana (es: nasion). La facilità nel raggiungere i singoli punti da collezionare ha condizionato un altro accorgimento: ogni cranio è stato separato dalla mandibola corrispondente, per evitare che le due strutture unite ostacolassero l'ottenimento delle coordinate dei punti posizionati nella porzione basale del cranio. Da letteratura, risulta che la separazione delle due entità non crea un ostacolo alle indagini di tipo filogenetico (Cardini et al., 2007). Nel caso in cui non fosse

possibile disgiungere totalmente le due strutture ossee, si dovrebbe ruotare la mandibola fino a permettere un corretto campionamento di ogni singolo landmark; nei casi in cui neppure la rotazione si rende ammissibile, il reperto va rimosso dal campione.

La scelta dei landmarks e la conseguente costruzione del *wireframe* rappresentano la fase di progettazione dell'indagine morfometrica. Quando sia i punti che il network sono presenti, l'indagine può proseguire con il campionamento vero e proprio: l'individuazione dei lmk selezionati sui singoli campioni di cranio e mandibola e il trasferimento delle loro coordinate sul computer attraverso il puntatore laser. I campioni vengono disposti col lato sinistro rivolto verso l'alto e fissati a della plastilina precedentemente disposta sul tavolo, al fine di evitare movimenti accidentali durante la fase di "tastatura" (Cardini et al., 2007) (Fig. 7).

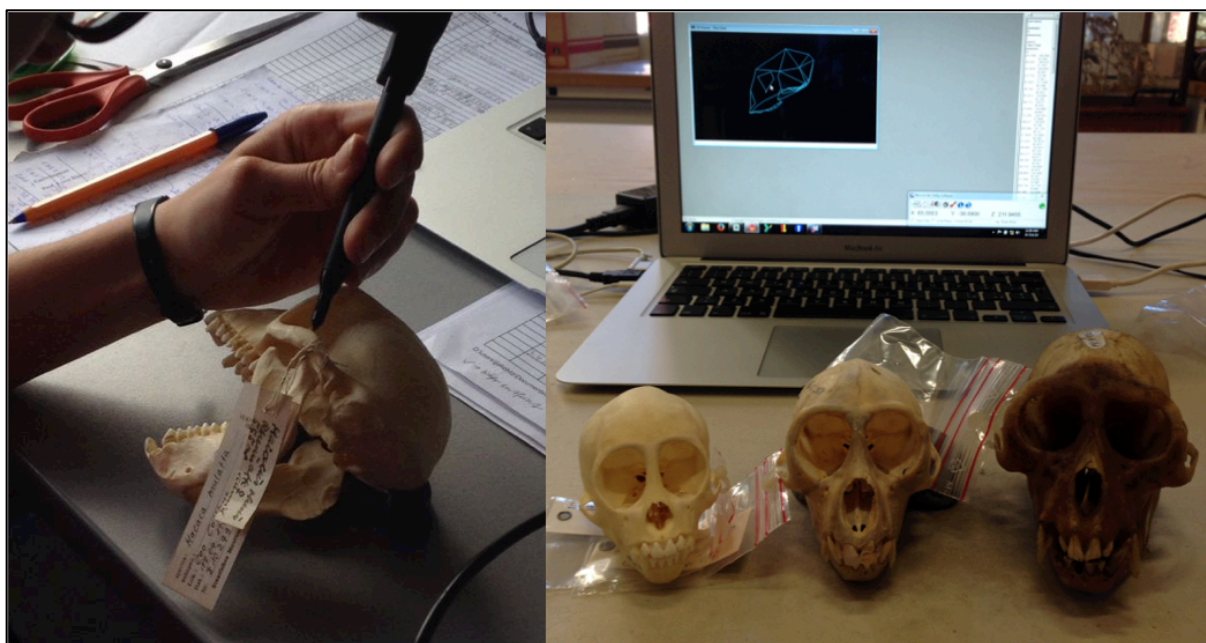


Figura 7. A sinistra, campionamento di un cranio con il Microscribe; a destra, ricostruzione dei crani effettuata al computer.

Poiché lo scopo dell'intero lavoro consiste nella ricostruzione della forma dei singoli oggetti, è fondamentale che essi non cambino posizione durante il campionamento; in caso contrario, ciò che verrà ricostruito non corrisponderà fedelmente agli oggetti che si hanno di fronte. Qualora un reperto si sposti nel mezzo del campionamento, l'operazione dovrà ricominciare da capo. Neppure il corpo fisso dello strumento può muoversi durante la collezione dei punti, dal momento che esso rappresenta il sistema di coordinate di riferimento. I campioni vanno fissati in modo che non si muovano e che ogni loro lmk sia facilmente raggiungibile dalla punta del Microscribe. È bene verificare la piena raggiungibilità di ogni punto prima di cominciare per non ritrovarsi, a campionamento iniziato, impossibilitati a raggiungere alcuni punti e costretti, quindi, a dover ricominciare daccapo. Se il campione è collocato correttamente (fisso e

facilmente raggiungibile) e il Microscribe è collegato al computer, si può iniziare a collezionare le coordinate dei landmarks: ciò consiste nel posizionare la punta dello strumento sul primo lmk selezionato e nel mantenerla ferma giusto il tempo di inviare il comando allo strumento; ricevuto il comando, il puntatore riporta le coordinate di quello specifico landmark sul pc (Fig. 7). Trattandosi di ricostruzioni tridimensionali, ogni coordinata è costituita da tre valori (X, Y e Z). Attraverso il collegamento diretto tra il Microscribe e il pc, i tre valori vengono riportati su un foglio Excel: la sequenza con cui sono enumerati nell'elenco corrisponde alla sequenza del *wireframe* prestabilita. A questo punto, il procedimento dev'essere reiterato su tutti i punti successivi del *wireframe*, facendo attenzione a collezionarli nella sequenza preimpostata, sia che si tratti del cranio che della mandibola. Per ogni singolo reperto considerato nella sua totalità (cranio + mandibola), si crea uno specifico file Excel sul computer, con riportati un codice univoco per le due strutture ossee e due distinti elenchi di coordinate: ciò viene fatto per evitare confusione tra gli elenchi di differenti campioni. Quando anche l'ultimo landmark è stato campionato, teoricamente si potrebbe passare al reperto successivo; tuttavia, è consigliabile eseguire un controllo dopo ogni singolo campione per verificare che tutto sia stato svolto correttamente. Per fare ciò, le coordinate riportate su Excel vengono copiate tali e quali all'interno di un apposito foglio in formato .txt, già preparato con la sintassi dello specifico software che li leggerà (Pan et al., 2003). La sintassi riporta le informazioni di cui necessita il programma per operare: il numero di campioni e di dimensioni e le coordinate dei singoli punti prese da Excel (O'Higgins & Jones, 2006). Poiché il software necessita anche del numero di landmarks collezionati, le coordinate del cranio devono essere separate da quelle della mandibola corrispondente: il motivo sostanziale è rappresentato dal fatto che sono stati selezionati differenti punti per l'uno e per l'altra. Si creano, dunque, due distinti file .txt, seguendo la sintassi del software scelto.

Se il programma legge il file senza problemi e ricostruisce fedelmente la forma dell'oggetto, significa che non è stato riscontrato alcun errore e si può procedere con i campioni seguenti. Poiché questo passaggio permette di accorgersi in tempo reale della presenza o meno di errori, è consigliabile trasferire i dati ottenuti sul software alla fine di ogni collezione di coordinate.

Dopo aver verificato l'esatto campionamento del reperto, collezionato le coordinate di tutto il materiale selezionato e appurato il corretto inserimento sul software, dal punto di vista della morfometria geometrica tridimensionale le procedure possono considerarsi concluse. I reperti possono essere catalogati nel database digitale, in cui vengono riportate informazioni ricavate sia dall'osservazione diretta del campione che dall'etichetta museale: il codice identificativo del museo, il museo in cui si trova, il nome scientifico, il sesso e l'età, la provenienza

geografica, lo stato di conservazione e l'eventuale presenza di *missing landmarks*. L'insieme delle azioni appena descritte si riferisce ad un singolo campione, ma è stato mantenuto invariato per tutti i campioni e in tutti i siti di campionamento.

2.1.4 Il campionamento

Lavorando su reperti scheletrici, si rivela quanto mai necessario rivolgersi alle collezioni presenti nei musei di storia naturale, per ottenere un campione adeguato su cui lavorare. Tappa fondamentale, pertanto, è stata quella di contattare i musei – sia italiani che esteri – al fine di ricavare informazioni sulle loro collezioni primatologiche (Bruner & Gippoliti, 2006; Gippoliti, 2007) e sull'accessibilità delle strutture nei periodi richiesti. Sono stati selezionati otto musei, di cui cinque italiani, due europei e uno africano: Museo di Zoologia La Specola (Firenze, Italia), Museo di Storia Naturale (Calci, Italia), Museo di Antropologia ed Etnologia (Firenze, Italia), Museo di Zoologia (Bologna, Italia), Museo Civico di Storia Naturale (Milano, Italia), Senckenberg Natural History Collection (Dresda, Germania), Museum National d'Histoire Naturelle (Parigi, Francia) e Amathole Museum (King William's Town, Sudafrica). In aggiunta, sono stati campionati alcuni crani conservati nel laboratorio di Antropologia di Palermo.

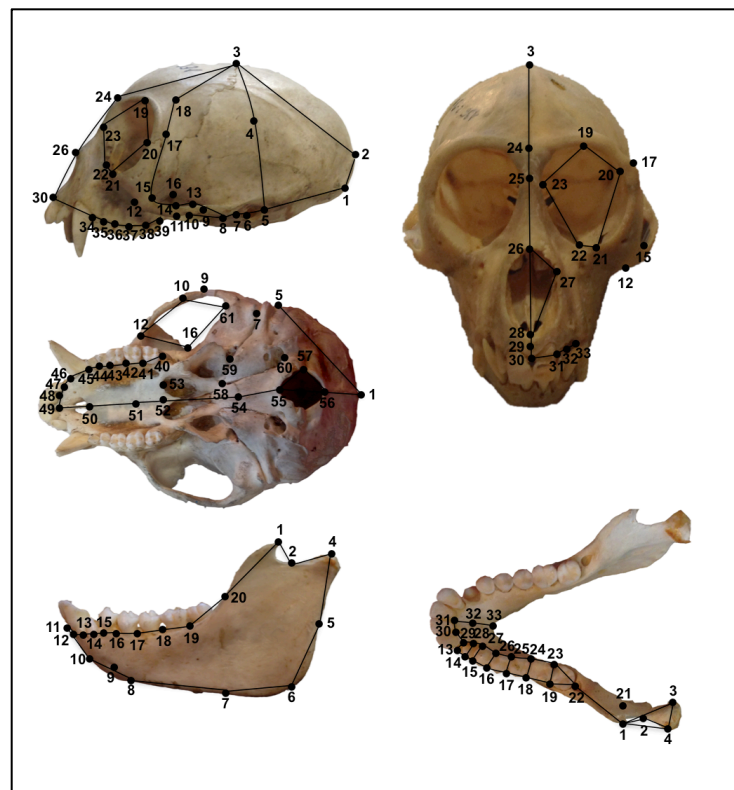


Figura 8. Landmarks sul cranio e sulla mandibola.

In ognuno di essi sono stati trasportati il Microscribe e il pc portatile per le ricostruzioni tridimensionali. Inoltre, il protocollo di campionamento è stato mantenuto invariato in tutti i siti, così come l'operatore che ha preso le misure, al fine di mantenere sotto controllo la probabilità di errore dovuta allo sperimentatore. Le ricostruzioni tridimensionali sono state effettuate attraverso la selezione di 61 landmarks (lmks) per il cranio e 33 per la mandibola, con un bilancio di 94 lmks complessivi (Fig. 8). L'elenco completo è disponibile nella sezione Allegati, nelle Tabelle 4 e 5. In totale, sono stati campionati 1126 crani e 1067 mandibole di esemplari appartenenti a 42 specie di Catarrhini, di cui 1024 crani (91%) e 965 mandibole (90%) di Cercopithecini e il rimanente centinaio appartenente a 11 specie di outgroup (Superfamiglie Cercopithecoidea e Hominoidea) (Tab. 7 e 8). L'ammontare complessivo di specie di Cercopithecini collezionate è 31, valore che rappresenta la quasi totalità delle specie riconosciute all'interno della tribù (Groves, 2001). Ad eccezione del monospecifico gruppo *dryas*, la cui unica specie *C. dryas* è considerata rara e con una distribuzione puntiforme (Butynski et al., 2013), tutti gli altri *species groups* sono rappresentati da una o più specie. La differenza tra i crani e le mandibole nel numero di reperti collezionati deriva dal fatto che non tutti i crani riportavano la mandibola corrispondente o quest'ultima presentava uno stato di conservazione tale per cui risultava impossibile effettuare le misurazioni. Il grado di conservazione dei campioni museali è un aspetto soggetto a variazione indipendente dall'operato dei ricercatori: i campioni non destinati all'esposizione, infatti, possono apparire in qualunque condizione, non sempre riportata nei database ufficiali. Nel caso specifico dei Cercopithecini, la maggior parte dei reperti proveniva dalle spedizioni effettuate in Africa nei primi anni del Novecento, pertanto spesso si è trattato di campioni molto antichi.

Ad ogni specimen è stato associato un codice univoco, in aggiunta al codice del museo, in modo da garantire un singolo campionamento per esemplare. L'età è stata stimata in base alla dentizione (Holly Smith et al., 1994; Fleagle et al., 2010), che ha portato alla suddivisione del campione in tre raggruppamenti: *infanti* (tutti i molari assenti); *giovani* (l'ultimo molare mancante) e *adulti* (dentatura completa). Gli individui con chiari segni di deterioramento dei tessuti ossei (*anziani*) sono stati collocati all'interno della classe *adulti*. Avendola stimata sulla base della semplice osservazione, l'età è un dato presente per ogni campione. Poiché si fa riferimento a reperti museali, spesso mancanti di una dentatura completa, per la stima dell'età ci si è basati sulla presenza o meno degli spazi alveolari corrispondenti. Per il sesso, invece, ci si è affidati unicamente a quanto riportato sui cartellini, pertanto non è un dato disponibile per la totalità del campione: i reperti in cui il dato non era presente sono stati rimossi dalle analisi.

Benché i maschi di Cercopithecini presentino taglie generalmente maggiori (Cardini & Elton, 2008b), tale distinzione risulta efficace disponendo a priori di un largo dataset di riferimento; inoltre, solitamente i canini divergono tra i due sessi, ma essendo elementi spesso assenti o danneggiati nei crani conservati in museo, si è preferito non azzardare nessuna attribuzione.

Il campionamento è stato effettuato su ogni cranio recuperato in buono o mediocre stato di conservazione, sia completo che privo di appendice mandibolare; al contrario, le mandibole sprovviste di crani o associate a crani in cattive condizioni non sono state inserite nel database.

Anche tra le singole specie si ha variabilità nel numero di esemplari raccolti, da relazionare alla disponibilità delle collezioni museali e alla diffusione delle specie sul continente africano: le specie col più alto numero di esemplari riscontrato sono le appartenenti al gruppo *aethiops*, il più diffuso sul continente (Rowe et al., 1996; Cardini et al., 2007; Kamilar et al., 2009).

2.1.5 Le analisi statistiche

Nonostante ogni specie – e di conseguenza ogni genere – sia rappresentata da un numero diverso di reperti, da letteratura ciò non sembra rappresentare un ostacolo per il prosieguo delle analisi morfometriche (Cardini & Elton, 2008a, Christiansen, 2008). Per effettuare le analisi morfometriche, oltre a Morphologika v2.5 (O’Higgins & Jones, 2006), sono stati utilizzati anche i software MorphoJ v1.06d (Klingenberg, 2011) e Past v3.07 (Hammer et al., 2001), al fine di eseguire un controllo incrociato dei risultati (Cardini, 2013) ed effettuare analisi cladistiche. I due ultimi programmi hanno il grande vantaggio di leggere la sintassi dei file creati per Morphologika, pertanto non è stato necessario creare dei fogli di testo ad hoc per poterli utilizzare. Tutti gli elenchi di coordinate sono stati raggruppati in un unico file .txt cumulativo, con sintassi identica a quella dei singoli file .txt. Dal momento che i crani e le mandibole devono essere analizzati separatamente, perché caratterizzati da un differente numero di landmarks (lmks), sono stati creati due file cumulativi. Oltre al numero di individui e di landmarks, nei file cumulativi sono stati riportati il codice degli individui ed informazioni aggiuntive, come il genere e la specie di appartenenza, il sesso e l’età. È possibile, inoltre, inserire dei collegamenti tra coppie di lmks (*links*), in modo da creare una forma stilizzata degli oggetti analizzati che sia visualmente più comprensibile (Viscosi & Cardini, 2011) (Fig. 7, a destra). Tali rette si rivelano molto utili durante la fase di costruzione del reticolo di landmarks, per discriminare le zone ben definite da quelle a bassa risoluzione. Il numero di campioni inseriti nei due rispettivi file non corrisponde perfettamente al numero di reperti collezionati, a causa dell’assenza di qualche landmark in alcuni di essi: né Morphologika né

MorphoJ sono capaci di ovviare al problema (Cardini, 2013; Klingenberg, 2013), se non ricorrendo al calcolo di valori medi. Nel nostro caso specifico, tuttavia, abbiamo preferito eliminare gli specimen con *missing landmarks* dalle analisi.

In letteratura, il numero di landmarks utilizzato è estremamente variabile (Cardini et al., 2007; Christiansen, 2008; Fleagle et al., 2010), pertanto in aggiunta ai dataset completi (61 lmks sui crani e 33 sulle mandibole) ne sono stati create altri tre:

- “Crani senza molari” e “Mandibole senza molari”, composti dai reperti con tutti i landmarks ad eccezione di quelli posizionati sui molari, per consentire i confronti tra *adulti*, *giovani* ed *infanti*. L’ammontare complessivo è così sceso a 56 lmks per i crani (Fig. 9, a sinistra) e 28 per le mandibole (sono stati rimossi i landmarks n° 37, 38, 39, 41 e 42 sui crani e n° 17, 18, 19, 23 e 24 sulle mandibole).
- “Neurocranio-Facciale” ha preso in considerazione esclusivamente i punti localizzati sul facciale e sul neurocranio, pertanto è stato creato unicamente per i crani. I lmks si sono ridotti sensibilmente, da 61 a 19 (Fig. 9, a destra e Tab. 6): nonostante il basso numero di punti, la superficie è stata ben caratterizzata.

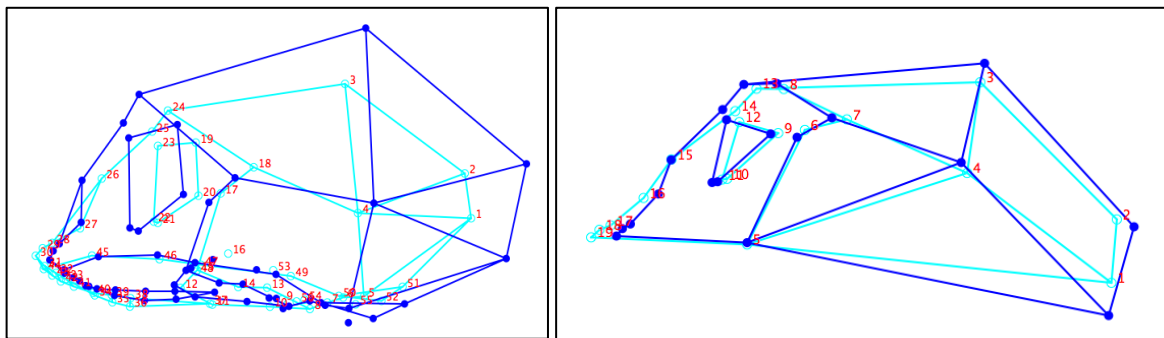


Figura 9. A sinistra, *wireframe* in norma laterale ricavato dalla PCA effettuata su adulti e infanti del dataset “Crani senza molari”; a destra, *wireframe* in norma laterale ricavato dalla PCA effettuata su adulti del dataset “Neurocranio-Facciale”. I due *wireframe* per ogni immagine (blu e celeste) rappresentano le forme maggiormente differenti.

Poiché la variabilità di alcune porzioni scheletriche può essere mascherata dall’omogeneità di altre, focalizzarsi esclusivamente su una singola porzione può rafforzare la discriminazione tra campioni. Infatti, abbiamo tratto vantaggio dalla ripartizione del cranio per testare l’ipotesi che alcune aree siano più conservative di altre e mascherino le variazioni di forma delle aree circostanti. Pertanto, ogni analisi è stata effettuata separatamente per ciascun database. Inoltre, per ognuno di essi è stato creato il sottoinsieme *Cercopithecus*, dal momento che questo genere sembra convogliare la maggior parte della variabilità all’interno della tribù (Rowe et al., 1996). In aggiunta, ogni set di dati è stato ulteriormente suddiviso sulla base del sesso e dell’età degli individui, per evitare l’interferenza di un fattore sull’altro.

Concluse le operazioni preliminari, è cominciata la parte di analisi numerica. Se il file non presenta errori, appare una videata in cui è consentito modificare il numero di individui o di landmarks da considerare per le analisi: se si esclude un landmark, lo si rimuove interamente dall'analisi per tutti i campioni inseriti. Inoltre, è possibile scartare tutti quegli specimen che si distanziano dalla forma media dei crani (o delle mandibole) inseriti, in quanto potenziali *outlier*: il controllo degli *outlier* va effettuato sia nella collezione intera che all'interno di ogni singolo sottogruppo (Viscosi & Cardini, 2011) e va ripetuto anche dopo l'esclusione dei primi *outlier* alla ricerca di altre eventuali deviazioni (Cardini et al., 2007). Per individuarli, ci si avvale della funzione "Find Outliers" in MorphoJ o si tiene nota degli elementi dissonanti che vengono fuori dalle analisi. Ultimate le modifiche, viene mostrato il reticolo di punti per ogni singolo reperto inserito e per la media di tutti i campioni, corrispondente all'insieme di landmarks collezionati durante il campionamento (*lollipop graph*) (Fig. 9). Su MorphoJ, inoltre, ad ogni punto è associato un vettore (*displacement vector*) che mostra la direzione di variazione di quel punto in specimen distinti. Ogni ricostruzione grafica dei campioni è distinta dalle altre, pertanto, è possibile evidenziare anomalie nella forma di specifici reperti precedentemente non rilevate.

Poiché la morfometria geometrica investiga le differenze nella forma (Fleagle et al., 2010), è necessario standardizzare la taglia per tutti i campioni e annullare le differenze di posizione durante il campionamento (Cardini et al., 2007; Cardini & Elton, 2008b): questo risultato si ottiene attraverso la *Generalized Procrustes Analysis* (GPA), un'analisi che separa le componenti della taglia da quelle della forma (Viscosi & Cardini, 2011). Questo passaggio è necessario per correggere la variabilità attribuibile alle differenti dimensioni dei campioni (in Morphologika: "Analysis → Procrustes Analysis"; in MorphoJ: "Preliminaries → New Procrustes Fit"). A questo punto, è necessario verificare se la forma media differisce statisticamente tra i differenti campioni, effettuando una analisi della varianza contro l'ipotesi nulla (H) che le differenze siano dovute al caso (Zelditch et al., 2004; Klingenberg, 2011): in presenza di coordinate tridimensionali si effettua una MANOVA, un'analisi della varianza multivariata (in MorphoJ, "Variation → Procrustes Anova") (Fleagle et al., 2010; Viscosi & Cardini, 2011). Nel caso in questione, i generi e le specie rappresentano i *main effects*, mentre i crani e le mandibole sono i *random effects* (quei fattori non definiti da un criterio a priori, poiché riflettono unicamente il campionamento) (Viscosi & Cardini, 2011). In aggiunta, sono state inserite anche le variabili "sesso", "età", "species groups" e "geolocalizzazione" come *additional effects*. "Genere" comprende i sei generi attualmente riconosciuti all'interno della tribù Cercopithecini (Grubb, 2006; Moulin et al., 2008; Fleagle et al., 2010; Butynski et al., 2013; Gilbert et al., 2014); "specie" include il numero totale di specie campionate durante lo

studio (Tab. 7); “sesso” si divide nelle due classi canoniche maschi e femmine, escludendo tutti gli specimen senza riferimenti nei cartellini; “età” ha permesso di distinguere i campioni in tre classi (adulti, giovani e infanti) (Tab. 8); “species groups” si riferisce ai gruppi super-specifici in cui è possibile distinguere il genere *Cercopithecus* (Tab. 9) e “geolocalizzazione” alla localizzazione sul continente Africano delle specie di *Cercopithecus* campionate (Ovest, Centro ed Est) (Tab. 10). Qualora la variabilità interspecifica risulti superiore a quella intraspecifica e all’errore di misura, è possibile giustificare la clusterizzazione in gruppi distinti; nello stesso modo, la variabilità intergenerica dev’essere maggiore di quella intra-generica per poter giustificare l’esistenza dei generi e rigettare H. Alla MANOVA va affiancato un t-test parametrico per verificare l’indipendenza dei campioni; con numeri ridotti, il test parametrico può essere sostituito dalle permutazioni (Viscosi & Cardini, 2011). Se l’analisi della varianza risulta significativa, si procede generando una matrice di covarianza a partire dalle coordinate procruste, per poter effettuare analisi comparative come la *Principal Component Analysis* (PCA) (in Morphologika: “Analysis → Principal Component Analysis”; in MorphoJ: “Variation → Principal Component Analysis”). L’analisi delle componenti principali (PCA) riassume l’intera variazione riscontrata all’interno del dataset nei principali assi che ne sono responsabili: generalmente, le prime 30-50 componenti principali (PC) riassumono una buona percentuale della variazione totale (Cardini et al., 2007). Quanto più i campioni si distribuiscono lungo una delle componenti, tanto più essa ne condiziona la variabilità. Su Morphologika, queste componenti possono essere comprese meglio esplorando lo spazio in cui sono distribuiti gli specimen: in tal modo, si evidenziano le porzioni maggiormente variabili lungo gli assi del piano cartesiano (Fleagle et al., 2010). La PCA non fa nessuna assunzione aprioristica, poiché suddivide gli elementi esclusivamente sulla base delle differenze che essi presentano. Per tale motivo, non sempre riesce a discriminare efficacemente tra le forme (Klingenberg, 2011), soprattutto se in partenza esse non esibiscono una grande variabilità interspecifica (Fleagle, 1998; Cardini & Elton, 2008b; Butynski et al., 2013). Le stesse variabili utilizzate nell’analisi della varianza (“genere”, “specie”, “sesso”, “età” e, per i soli campioni di *Cercopithecus*, “species group” e “geolocalizzazione”) sono state utilizzate anche per la PCA. Ogni variabile è stata investigata separatamente, al fine di testarne i singoli effetti e di individuare la variabile maggiormente influente.

Nonostante la GPA standardizzi la taglia degli oggetti in questione, il fattore taglia può ancora condizionare il trend di variabilità delle forme: infatti, può sussistere una condizione allometrica tra i due fattori, tale per cui i cambiamenti nella taglia influenzano largamente i cambiamenti di forma (Zelditch et al., 2004; Viscosi & Cardini, 2011). L’allometria si verifica dividendo il

dataset in sottoinsiemi ed effettuando, un gruppo alla volta, una regressione multivariata della forma nella taglia. Nel caso in cui le due variabili covarino, non siamo più in grado di stabilire quale porzione della variabilità sia da attribuire all'una e quale all'altra. Per correggere l'effetto taglia, si utilizza la MANCOVA (*Multivariate Analysis of Covariance*) (in MorphoJ: "Covariation → Regression"): tale metodo sfrutta il centroide – già standardizzato tramite GPA – come variabile indipendente, per testare l'affidabilità dei gruppi dopo aver rimosso la varianza attribuita alla taglia. Le coordinate procruste, invece, rappresentano la variabile dipendente. Usando i residui di una regressione è possibile correggere per l'effetto della taglia sulla forma (Klingenberg, 2011). Dopo aver rimosso le componenti della taglia, è stata nuovamente effettuata una PCA, al fine di controllare l'impatto della taglia sulla forma. Tuttavia, la regressione può distruggere le informazioni sulla forma insieme con quelle sulla taglia (Gilbert, 2011), ragion per cui i confronti pre- e post-correzione sono stati comparati con cautela. In seguito, è stata effettuata una PCA sulle forme medie dei generi e delle specie, utilizzando sia il centroide che le coordinate procruste come "data types", al fine di limitare il fattore "numero di campioni" nelle analisi. In ultimo, importando su MorphoJ due alberi molecolari (Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013) in formato .nexus, è stato possibile verificare la struttura filogenetica dei dati morfometrici (Comparison → Map Onto Phylogeny). Il software, infatti, effettua un test delle permutazioni contro l'ipotesi nulla che non ci sia segnale filogenetico nei dati (Klingenberg, 2011). Le coordinate procruste, inoltre, sono state importate anche su Past per effettuare analisi cladistiche, verificare l'esistenza di correlazioni cofenetiche tra i campioni e creare dei fenogrammi sulla base dei dati morfometrici (Multivariate → Clustering → Classical/Neighbour joining). Un fenogramma è la sintesi delle relazioni di similarità tra i campioni analizzati, poiché la distanza tra i campioni nell'albero è proporzionale alle loro differenze. Dal momento che gli alberi tendono a distorcere le distanze, è necessario tenere conto dell'Indice di correlazione cofenetica (C) che quantifica l'entità della distorsione: alti valori di C [1] implicano nessuna distorsione, bassi valori di C [0] alta distorsione (Viscosi & Cardini, 2011). Nel caso dell'analisi classica, l'algoritmo utilizzato è l'UPGMA. In entrambe le analisi, l'indice di similarità scelto è stato l'indice di Euclide.

2.2 LA CITOGENETICA

2.2.1 Introduzione

La comprensione dei meccanismi genomici responsabili della speciazione non si può ancora definire completa (Seehausen et al., 2014), complice anche l'assenza di un concetto di specie univoco e universalmente valido. Le barriere genetiche e cromosomiche limitano la fertilità degli ibridi ma, allo stesso tempo, contribuiscono all'insorgenza di varietà e specie (Solano et al., 2009; Lowry & Willis, 2010; Silva et al., 2015). Tuttavia, non è perfettamente chiaro se le differenze genetiche e i polimorfismi possano essere considerati direttamente responsabili dei fenomeni di isolamento specifico. A tal proposito, si può prendere come esempio il caso delle due tribù sorelle Papionini e Cercopithecini. Le specie della tribù Papionini sono riconosciute come entità biogeografiche indipendenti, pur presentando un numero estremamente ridotto di differenze genomiche, variabilità genetica o polimorfismi cromosomici. Al contrario, la tribù dei Cercopithecini è caratterizzata da intenso *reshuffling* genomico, numeri cromosomici altamente variabili e presenza di polimorfismi (Sineo et al., 1986; Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008). Numerosi sono i casi di ibridazione riportati per i Cercopithecini, sia in cattività che in natura (Gautier, 1988; Struhsaker et al., 1988; Colyn & Deleporte, 2002; Detwiler, 2002; Disotell & Raaum, 2002; de Jong & Butynski, 2010). Tuttavia, che l'ibridazione sia uno dei fattori trainanti l'evoluzione di questa tribù è ancora una questione irrisolta. Dallo studio del genoma umano è noto che la quantità di varianti polimorfiche che possono essere sopportate è bassa e limitata ai tratti eterocromatici autosomali delle aree pericentriche, ai distretti NOR e al braccio q del cromosoma Y (Shaffer et al., 2013). I polimorfismi, pertanto, dovrebbero essere considerati rari e profondamente avversati. Nei Papionini ciò sembra confermato, poiché gli eventi speciativi non sembrano essere correlati a profonde modifiche cromosomiche. Dal punto di vista cromosomico, un ridotto numero di riarrangiamenti (tra cui nessun evento di fissione) ha diminuito il numero diploide del cariotipo ancestrale delle catarrine (ACK) ($2n = 46$), stabilizzandolo sul 42 costante. Nei Cercopithecini, invece, i riarrangiamenti cromosomici appaiono preponderanti nella differenziazione cui si assiste oggi. Infatti, sono stati caratterizzati da un'evoluzione dominata da ripetute fissioni cromosomiche – robertsoniane e non-robertsoniane (o reciproche) – e modifiche nella posizione del centromero in seguito ad attivazione di centromeri silenti (Dutrillaux et al., 1988; Moulin et al., 2008; Stanyon et al., 2008; Stanyon et al., 2011). Il loro cariotipo ancestrale potrebbe essere derivato da quello dell'ACK attraverso due fissioni (HSA3 e HSA5) e una fusione (HSA20 e HSA21),

che avrebbero incrementato il numero diploide da 46 a 48, attualmente mantenuto soltanto da *A. nigroviridis* (Stanyon et al., 2008). In seguito, ulteriori modifiche cromosomiche avrebbero portato alla variabilità cariotipica attualmente riscontrabile nel gruppo (Butynski, 2002; Tosi et al., 2003). L'unione di HSA20 e HSA21 viene comunemente considerata una traslocazione robertsoniana, nonostante non sia perfettamente chiaro quanto materiale genetico venga scambiato e quanto perso. Essa rappresenta un'apomorfia riscontrabile esclusivamente nei cercopiteci s.l. (Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008): il cromosoma HSA21, infatti, presente in associazione sintenica con HSA3 nel cariotipo ancestrale dei Primati (APK), nell'ACK e nell'uomo appare come un'entità singola (Fig. 10); nei Papionini si unisce a HSA7, mentre nei Cercopithecini si associa a HSA20 in un unico cromosoma sub-metacentrico (Stanyon et al., 2008).

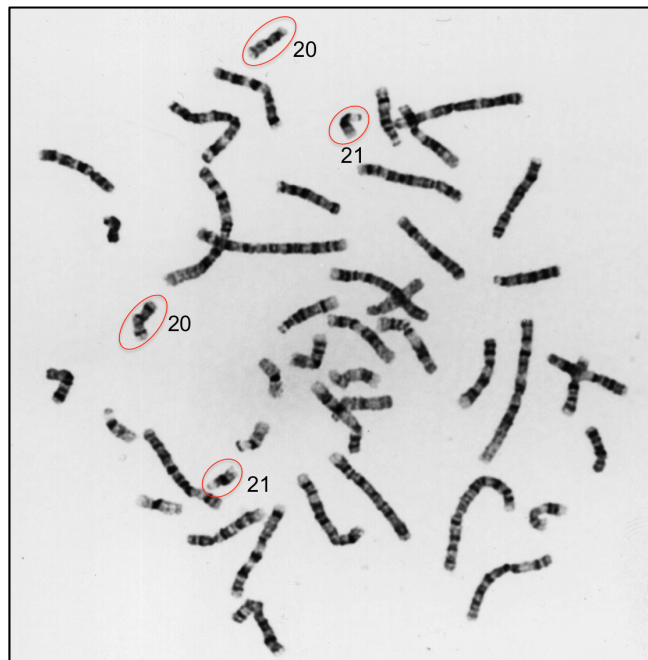


Figura 10. Cariotipo umano ottenuto tramite bandeggio G. I cerchi rossi evidenziano le coppie di cromosomi omologhi 20 e 21.

Si definisce sintenia la co-localizzazione sullo stesso cromosoma di due o più loci genici caratterizzati da una frequenza di ricombinazione inferiore a quanto ci si potrebbe attendere (Passarge et al., 1999). Le due fissioni (HSA3 e HSA5) e il probabile riarrangiamento dell'HSA6, invece, sono ancora oggetto di studio, mentre sicuramente una fissione (HSA5) è assente in almeno una specie di Cercopithecini (i.e.: *nigroviridis*) (Stanyon et al., 2008).

La sintenia 20/21, oltre a caratterizzare il taxon, si distingue anche per il polimorfismo ad essa associato: sia all'interno della stessa specie che in specie diverse si può presentare in due forme, omo- ed eterozigotica (Ponsà & Egozcue, 1981; Sineo et al., 1986). Ciò potrebbe essere

dovuto alla variabilità nella posizione del centromero, causata dalla coesistenza di un nuovo centromero con un vecchio non disattivatosi (Stanyon et al., 2008; Rocchi et al., 2012). Il polimorfismo in questione, essendo stato riscontrato in buona parte dei raggruppamenti della tribù (Ponsà & Egozcue, 1981; Sineo, 1990; Moulin et al., 2008), rappresenta un polimorfismo transpecifico (TSP): scartando l'ipotesi dell'evoluzione convergente, la condivisione palese un'origine ancestrale e la permanenza nel tempo rivela l'azione della selezione stabilizzante (Klein et al., 1998) che l'ha mantenuto nonostante l'assenza di un apparente vantaggio. Poiché, nel corso della storia evolutiva dei Cercopithecini, molte sentinelle sono state rotte (Romagno et al., 2000), mentre la HSA20/21 è rimasta intatta fino ai nostri giorni, essa potrebbe essere un valido indizio della reale consistenza della tribù come unità tassonomica. A differenza della fissione dell'HSA5, infatti, sembrerebbe pre-datare la speciazione all'interno della tribù, rappresentando così una sinapomorfia.

Attraverso la citogenetica, è stato possibile indagare l'esistenza della sentinella e del polimorfismo ad essa associato in alcune specie di cercopiteci s.l. La citogenetica è lo studio della morfologia e del numero di cromosomi presenti in una cellula, ovverosia l'analisi del cariotipo di una specie. Lo stato attuale delle conoscenze permette di far sempre più affidamento sulla genetica per rispondere a quesiti disparati, dal momento che le differenze tra specie risiedono anche e soprattutto a livello molecolare. I cromosomi, infatti, racchiudono molte informazioni sugli eventi di speciazione. Uno dei parametri principali che permette la discriminazione tra i Papionini e i Cercopithecini è costituito proprio dal numero di cromosomi: sempre uguale a 42 nei primi, maggiore di 42 nei secondi (Glenn & Cords, 2004).

2.2.2 I protocolli

Per potersi avvalere dell'approccio citogenetico, sono state messe in pratica tre tecniche di bandeggio (G, C e Ag-NOR), l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) e il *painting* cromosomico.

Il bandeggio consiste nel colorare selettivamente le porzioni di eucromatina rispetto a quelle di eterocromatina, ottenendo una sequenza di bande cromosomiche diagnostiche per ogni specie (Mitelman, 1995). Nel bandeggio G, le porzioni di eucromatina ricche in GC si colorano debolmente, apparendo come bande chiare al microscopio; viceversa l'eterocromatina, ricca di AT, per il suo alto livello di impacchettamento, si colora intensamente ed appare sotto forma di bande scure all'osservazione microscopica (Fogle & Wood, 1981; Amaral et al., 2008) (Sez. Allegati, Protocolli di Laboratorio). I reagenti che vengono utilizzati sono:

- Sali (NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4);
- Tripsina in PBS (*Phosphate Buffered Saline*);
- HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*);
- Giemsa in Sorensen's Buffer;
- dH_2O .

A differenza delle bande G che si distribuiscono per l'intera lunghezza dei cromosomi, le bande C evidenziano specifiche strutture cromosomiche, dando origine ad un numero ristretto di bande (Mitelman, 1995) (Protocolli di Laboratorio). Infatti, le bande C evidenziano le sequenze geniche ripetute, localizzate principalmente nelle regioni centromeriche. Al microscopio, i centromeri appaiono scuri, mentre il resto del cromosoma non si colora. I reagenti che si utilizzano per questo bandeggio sono:

- Soluzione di BaOH ;
- $\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{N HCl}$;
- 2x SSC (*Saline Sodium Citrate*);
- Giemsa in Sorensen's Buffer (6.8 pH);
- dH_2O .

Così come le bande C, anche il metodo Ag-NOR coinvolge porzioni ristrette dei cromosomi (Protocolli di Laboratorio). Il nitrato d'argento, infatti, si utilizza qualora si voglia evidenziare la regione organizzatrice del nucleolo (NOR). Questa regione è la localizzazione nucleare e cromosomica della sintesi dell'RNA ribosomiale (Hennig, 1999).

I reagenti adoperati per evidenziarla sono:

- Soluzione di AgNO_3 50%;
- Gelatina + Acido formico
- dH_2O .

L'Ibridazione Fluorescente In Situ (FISH) è una tecnica molecolare che consiste nell'ibridazione di sonde di DNA, marcate con una sostanza fluorescente, con DNA di una metafase "target" (Fig. 11). Questa tecnica sfrutta la complementarità delle basi azotate della sonda e del target, permettendo di individuare le omologie cromosomiche tra specie diverse (Saccone, 1998; Wilkinson, 1998) (Protocolli di Laboratorio). Questo metodo di marcatura di filamenti di DNA e di formazione di ibridi molecolari può essere suddiviso in 5 passaggi:

1. Marcatura della sonda;

2. Denaturazione della sonda;
3. Trattamento dell'acido nucleico da identificare;
4. Ibridazione tra i due acidi nucleici;
5. Rilevamento dell'ibridazione.

Col nome di sonde vengono indicati gli acidi nucleici coniugati con molecole antigeniche, riconoscibili da specifici anticorpi. Le molecole antigeniche più comuni sono la biotina (vitamina H o coenzima R) e la digoxigenina (DIG), apteni che si coniugano ai deossinucleotidi trifosfati (dUTP). L'anticorpo che riconosce e lega la biotina è comunemente l'avidina; nel caso della digoxigenina ne vengono usati molteplici (anticorpi anti-digoxigenina) (Saccone, 1998; Wilkinson, 1998). Gli anticorpi, prima di essere utilizzati nel processo di marcatura, vengono coniugati a loro volta ad un fluorocromo, una sostanza che emette luce a particolari lunghezze d'onda rilevate dal microscopio a fluorescenza (Nederlof, 1990). L'avidina normalmente si trova legata alla fluoresceina (*fluorescein isothiocyanate 1* o FITC) e la digoxigenina alla rodamina o al texas red (*sulforhodamine 101 acid chloride*) (Saccone, 1998). Il FITC risponde all'emissione di luce blu (450 – 500 nm) ed emette luce verde (500 – 550 nm). Il filtro per la rodamina, invece, ha una luce eccitante verde (550 – 600 nm), cui il fluorocromo risponde con una luce emittente rossa (600 – 650 nm) (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA).

La sonda scelta viene marcata attraverso un processo chiamato *Nick translation*, una tecnica di marcatura (*tagging technique*) che consiste nella creazione di interruzioni nella catena di acidi nucleici e nella successiva incorporazione, da parte della DNA Polimerasi I, di nucleotidi biotinilati nel filamento di DNA: il risultato è una sonda costituita in parte da DNA biotinilato, cioè marcato (Hirai & Hirai, 2004). La sonda così modificata viene sottoposta a denaturazione attraverso l'innalzamento della temperatura (5-10' a 95°C). La denaturazione consiste nella rottura dei legami tra le basi azotate dei due differenti filamenti costituenti la molecola di DNA, con il risultato che in soluzione si avranno filamenti singoli e spaiati. È fondamentale che, in questa fase, i filamenti non si appaiano di nuovo l'uno con l'altro, ma rimangano separati per appaiarsi in seguito con gli omologhi della seconda specie (Saccone, 1998; Wilkinson, 1998). La temperatura di denaturazione è funzione del contenuto in GC/AT (Ririe et al., 1997), ma non variando eccessivamente le caratteristiche intrinseche al materiale nucleare tra specie e specie, viene mantenuta solitamente costante indipendentemente dagli organismi che si stanno studiando. Finito di dedicarsi alla manipolazione della sonda, bisogna trattare le metafasi con cui si è deciso di ibridare le sonde marcate. Nel caso in esame, le sonde

sono costituite da DNA umano, mentre le metafasi derivano da materiale nucleare di primati. Le cellule ottenute da campioni di tessuto di alcune specie di primati sono state trattate con fitoemoagglutina (PHA), una sostanza conosciuta da tempo che induce la divisione mitotica nelle cellule (Nowell, 1960). Al momento desiderato, quando i cromosomi sono più compatti – fase di metafase – si inserisce il colcemid, una sostanza bloccante che depolimerizza i microtubuli, impedendo la formazione del fuso mitotico responsabile della migrazione dei cromosomi verso le due cellule di neoformazione: in questo modo le cellule vengono cristallizzate nella fase desiderata e sul vetrino si potranno osservare gruppi di cromosomi condensati, con cui è possibile procedere verso le altre fasi dell'ibridazione (Brinkley et al., 1967). Oltre a ciò, è possibile che i cromosomi debbano essere trattati enzimaticamente e chimicamente per facilitare l'ingresso della sonda durante la fase successiva. Usualmente, i vetrini si denaturano in Formamide al 99% e Alcol (tre lavaggi consecutivi al 70%, 90% e 100%) (Heng & Tsui, 1993).

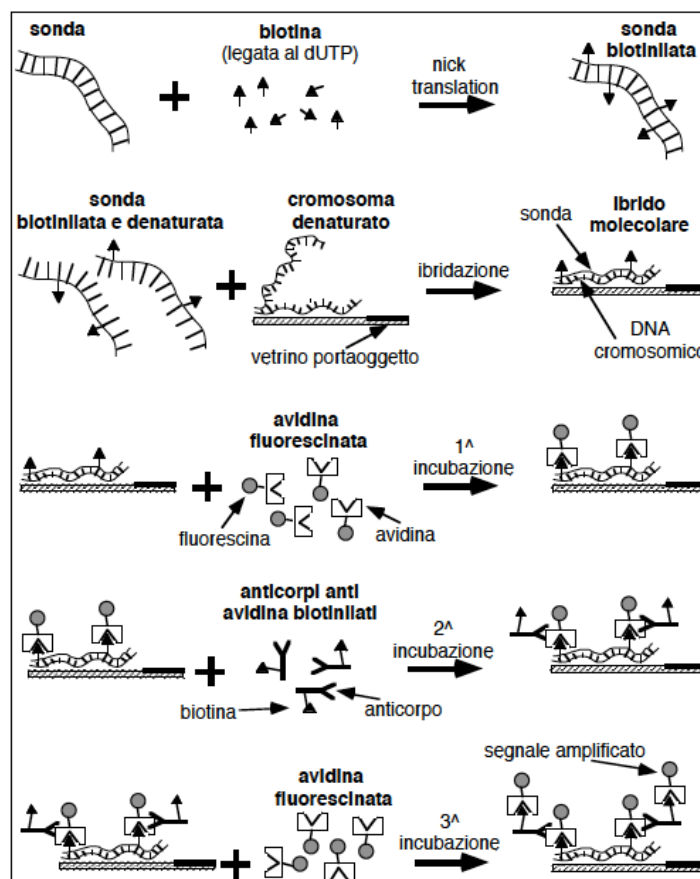


Figura 11. Schema riassuntivo dell'ibridazione in situ su cromosomi metafasici (Saccone, 1998).

Il passaggio successivo, infatti, è proprio l'ibridazione tra i due materiali nucleari: le sonde umane e le metafasi di primate. La sonda biotinilata e denaturata – presente, quindi, sotto

forma di filamenti di DNA singoli e non a doppia elica – viene incubata a temperature ben precise per un tempo definito, in modo da favorirne l’ibridazione con il DNA dei cromosomi sul vetrino (Saccone, 1998; Wilkinson, 1998). La temperatura cui far procedere l’accoppiamento tra le eliche è funzione della distanza filogenetica tra le specie in esame: maggiore è la distanza, più bassa dovrà essere la temperatura; viceversa ridotta è la distanza, più si potrà innalzare la temperatura, favorendo esclusivamente gli accoppiamenti perfettamente complementari. A temperature troppo basse, tuttavia, si corre il rischio di amplificare frammenti di DNA non specifici, pertanto, la temperatura dev’essere cautamente selezionata (Rychlik et al., 1990; Wilkinson, 1998). Il risultato è la formazione di un ibrido molecolare, costituito al 50% da DNA umano e al restante 50% da DNA di primate (Fig. 11).

Il *painting* cromosomico consente di individuare le omologie a livello di interi cromosomi – o parti di essi – e i riarrangiamenti inter-cromosomici (traslocazioni, fissioni e fusioni) che sono intervenuti durante il processo evolutivo. È possibile, cioè, determinare quali cromosomi, segmenti di cromosoma o sintenie (e quindi anche la localizzazione di due o più geni su uno stesso cromosoma) siano stati conservati tra i genomi delle specie a confronto. La colorazione cromosomica permette, inoltre, di determinare quanti riarrangiamenti differenziano il genoma di una specie da quello di un’altra (Sineo & Romagno, 2004). Negli ultimi anni sono state utilizzate anche sonde *subregionali* o *locus*-specifiche prodotte mediante micro-dissezione o per clonaggio di DNA all’interno di vettori (Wienberg et al., 1990).

L’ultima fase della procedura è costituita dal rilevamento dell’ibridazione mediante un microscopio a fluorescenza, la cui emissione di luce stimola i fluorocromi all’emissione, a loro volta, di radiazioni a diversa lunghezza d’onda rilevate per mezzo di appositi filtri.

I cinque passaggi sopra descritti si esplicano in tre differenti sessioni di laboratorio. Nella prima – la “**precipitazione**” – il DNA della sonda umana viene inserito in una soluzione che ne favorisce la precipitazione vera e propria, ovvero sia il passaggio del materiale nucleare dalla fase liquida dispersa a quella viscosa più concentrata. Per facilitare il processo, la soluzione resta in incubazione in freezer tutta la notte a -20°C. Nella seconda – l’“**ibridazione**” – sonda e metafasi vengono poste in contatto direttamente sul vetrino (già preparato in precedenza), su cui sono presenti le metafasi di primate. I reagenti così disposti sono inseriti in camera umida, a 37°C, per tutta la notte. I vetrini possono essere utilizzati anche a distanza di mesi ed anni, poiché i cromosomi cristallizzati in fase di metafase vanno incontro ad un deterioramento molto lento se conservati a basse temperature. In ultimo, si mette in atto la terza sessione – la “**detection**”. Nel caso di un’ibridazione indiretta, i vetrini devono essere ricoperti per 10’ da una soluzione di anticorpo (avidina o antidigoxigenina)

coniugato con fluorocromi, cui si fa seguire la colorazione dei cromosomi con una soluzione di un fluorocromo azzurro (4',6-diamidino-2-phenylindole o DAPI) e una sostanza che inibisce il decadimento della fluorescenza (antifade). Dopo la rilevazione del segnale d'ibridazione con reagenti immunofluorescenti, infatti, anche i cromosomi devono essere colorati per mezzo di una sostanza fluorescente di contrasto, altrimenti non sarebbero visibili. Nel caso dell'ibridazione diretta – eventualità che si verifica qualora i nucleotidi venissero direttamente coniugati con i fluorocromi – si salta il passaggio con l'anticorpo e si procede direttamente alla colorazione dei cromosomi con DAPI-Antifade (Saccone, 1998; Wilkinson, 1998). A questo punto sarebbe già possibile osservare la fluorescenza al microscopio, ma è preferibile lasciare i vetrini in frigo per qualche ora o per tutta la notte, di modo che i reagenti possano entrare perfettamente in contatto e i legami possano fissarsi nel migliore dei modi. Quando si ritiene che il tempo di reazione sia stato sufficiente, si può procedere con l'osservazione.

2.2.3 Il campionamento

Il campionamento citogenetico si è svolto in due distinti laboratori: il Laboratorio di Antropologia del Prof. Sineo, all'interno del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo e il Laboratorio di Antropologia del Prof. Stanyon, all'interno del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università degli Studi di Firenze. Le specie analizzate sono sei, di cui quattro appartenenti alla tribù dei Cercopithecini (*Cercopithecus petaurista* CPE, *C. mitis* CMI, *C. (Chl.) aethiops* CAE, *Erythrocebus patas* EPA), una alla tribù Papionini (*Macaca sylvanus* MSY) e un'altra alla tribù Hominini (*Homo sapiens* HSA). L'elevato livello di protezione cui sono sottoposti i primati e l'esiguo numero di individui di alcune specie rendono estremamente difficile il reperimento di materiale biologico per le analisi. I vetrini in possesso sono stati ottenuti mediante campionamenti in natura o in cattività eseguiti dal Prof. Sineo (CMI, CPE e CAE) e colture conservate presso il laboratorio "Comparative Genomics" del National Cancer Institute (Frederick, MD, USA) (EPA e MSY). Le metafasi di HSA sono state ottenute tramite un prelievo di sangue effettuato durante la permanenza a Firenze, mentre le sonde umane derivano da una collaborazione del Prof. Stanyon con il National Cancer Institute (USA) e con il Dipartimento di Biologia dell'Università di Bari.

Per ogni specie sono state effettuate diverse colorazioni di bandeggio e diverse ibridazioni, al fine di confermare il risultato ottenuto la prima volta. Non è stato necessario il trasporto di nessuna apparecchiatura o reagente particolare per il campionamento a Firenze, mentre a

Palermo sono state trasportate le sonde umane per poterle ibridare sui vetrini presenti presso il laboratorio di Antropologia. I protocolli utilizzati sono stati allestiti nel laboratorio del Prof. Stanyon e, in seguito, mantenuti invariati anche nel laboratorio di Palermo. In tal modo, è stato possibile evitare l'introduzione di variabili indesiderate ed effettuare le operazioni secondo le necessità degli sperimentatori e non degli specifici luoghi. Alcuni esperimenti di ibridazione sono stati svolti in collaborazione con la Dr.ssa F. Dumas presso il laboratorio di Antropologia del Dipartimento STEBICEF.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 LA MORFOMETRIA GEOMETRICA

Effettuato il campionamento, il primo passaggio dell'indagine morfometrica ha riguardato la ricerca degli *outliers*, quegli elementi la cui media si discosta eccessivamente dalla media del resto del campione (Cardini et al., 2007). In questa ricerca, è emerso che i crani di *Homo sapiens* e *Pongo pygmaeus* apparivano sostanzialmente diversi dagli altri. Per evitare che la loro grande variabilità potesse minimizzare le differenze tra i crani oggetti di studio, entrambi i generi sono stati rimossi dalle indagini. Sono stati rimossi anche i campioni con *missing landmarks* e, durante le analisi sul sesso, gli specimen senza etichetta. Al fine di testare la legittimità dei generi *Chlorocebus* e *Allochrocebus*, gli specimen appartenenti a questi due gruppi sono stati separati dal genere *Cercopithecus* nel corso delle analisi.

I giovani (JUV) e gli infanti (INF) sono stati inseriti esclusivamente nelle indagini iniziali, al fine di evidenziare la presenza di differenze ontogenetiche nella forma dei crani delle specie oggetto di esame. L'analisi delle componenti principali per la variabile "età" mostra una netta ripartizione degli individui in classi di età (Fig. 12).

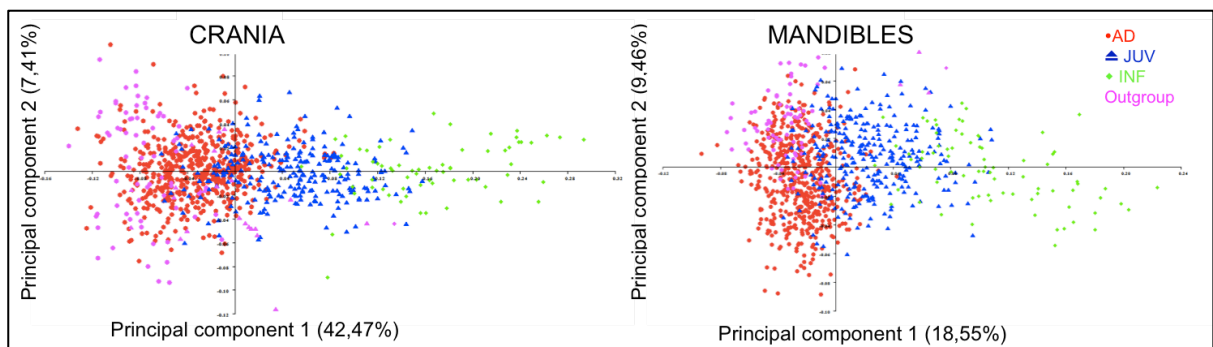


Figura 12. Grafico delle component principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma negli individui campionati, in relazione alla variabile "età". I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza.

Dalla forma infantile (diamanti verdi) a quella adulta (cerchi rossi) l'andamento è quasi rettilineo lungo la prima componente principale (PC1), ad indicare un restringimento del neurocranio e un allungamento dello splancnocranio negli individui adulti. La transizione risulta più accentuata per quanto riguarda i crani, mentre le mandibole si mostrano maggiormente disperse lungo la PC2, la quale rappresenta l'altezza dei rami mandibolari. Riassumendo il contributo delle due componenti principali, gli adulti presentano crani allungati e mandibole alte, mentre gli infanti sono caratterizzati da volte arrotondate e strutture

più corte. In entrambi i corpi ossei, il cranio e la mandibola dei giovani rappresentano una forma intermedia tra le altre due classi (Fig. 12, triangoli blu). Gli outgroup sono costituiti quasi esclusivamente da individui adulti (cerchi rosa) disposti alla sinistra degli individui adulti di Cercopithecini (cerchi rossi), ad indicare una ripartizione in classi di età presumibilmente analoga. La stessa analisi effettuata in assenza di outgroup non ha mostrato differenze significative nella distribuzione degli specimen di cercopiteci. In tutte le successive analisi sono stati presi in considerazione solamente individui adulti, per un totale di 700 crani. Un'altra considerazione importante ha riguardato i gruppi con un ridotto numero di appartenenti. Infatti, al di sotto di un determinato valore soglia ($n < 15$), si corre il rischio di inficiare le analisi statistiche (Cardini & Elton, 2008a). Pertanto, le analisi sono state effettuate sia con che senza i gruppi con meno di 15 campioni. Poiché non sono state riscontrate differenze significative tra i risultati ottenuti prima e dopo la rimozione, i gruppi suddetti sono stati reintrodotti. Inoltre, nessuna differenza significativa è emersa nel confronto tra i dataset col massimo numero di landmark (61 per i crani e 33 per le mandibole) e i tre con numero diverso di punti (“Crani senza molari [56]”, “Mandibole senza molari [28]” e “Neurocranio-facciale [19]”). Infatti, nonostante le analisi effettuate sui tre sottoinsiemi di landmarks aggiuntivi abbiano mostrato valori statisticamente significativi ($p < 0.0001$) nei test della varianza effettuati (Fig. 13), non sono stati evidenziati risultati statisticamente differenti tra di loro. Ciò significa che non esistono aree maggiormente soggette a variabilità nel cranio dei Cercopithecini poiché la variabilità globale segue un andamento uniforme. A tal proposito, si è deciso di mostrare unicamente i risultati dei dataset col numero maggiore di landmarks (66 e 33), relativi alle analisi effettuate sugli individui adulti.

Procrustes ANOVA: Procrustes ANOVA 56lmks							
Dataset: Crani 56lmks							
Classifiers used for the Procrustes ANOVA:							
Extra main effect(s):							
-- Extra 1: Genera							
-- Extra 2: Species							
-- Extra 3: Sex							
-- Extra 4: Age							
Individuals: Individual							
Centroid size:							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)		
Extra 1	341147,663582	56857,943930	6	142,01	<.0001		
Extra 2	79771,437282	2045,421469	39	5,11	<.0001		
Extra 3	104974,919346	52487,459673	2	131,09	<.0001		
Extra 4	345917,431297	172958,715648	2	431,98	<.0001		
Individual	353937,630950	400,381935	884				
Shape, Procrustes ANOVA:							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Extra 1	1,07538746	0,0011132375	966	25,40	<.0001	3,59	<.0001
Extra 2	1,08739952	0,0001731804	6279	3,95	<.0001	9,76	<.0001
Extra 3	0,28907693	0,0008977544	322	20,49	<.0001	0,70	<.0001
Extra 4	2,34661852	0,0072876352	322	166,29	<.0001	1,23	<.0001
Individual	6,23726665	0,0000438244	142324	NaN	NaN		

Figura 13. MANOVA effettuata sui crani adulti del dataset “Crani senza molari”, utilizzando le variabili “genere” e “specie” come *main effects* e le variabili “sesso” ed “età” come *additional effects*.

Le analisi delle componenti principali eseguite sui crani adulti in relazione alla variabile “genere” mostrano l’esistenza di 4 cluster di crani (Fig. 14), mentre quelle effettuate sulle mandibole degli adulti ne mostrano tre (Fig. 15). Per quanto riguarda il grafico della PCA relativo ai crani (Fig. 14), la distribuzione sembra guidata principalmente dal fattore taglia, poiché il genere con dimensioni inferiori (*Miopithecus*) e quelli con taglie più grandi (*Erythrocebus* e gli outgroup) si dispongono perfettamente agli estremi, con gli individui di taglia intermedia al centro (gruppo *Cercopithecus*). La clusterizzazione mostrata è confermata da studi precedenti (Cardini & Elton, 2008a). Nonostante l’analisi procruste (GPA) e l’analisi della regressione, il fattore taglia continua ad influenzare in maniera preponderante la forma dei crani. Sfortunatamente, non esistono tecniche universalmente valide nell’ambito della morfometria geometrica tridimensionale per correggere l’effetto della taglia sulla forma (Gilbert, 2011). La GPA, infatti, non elimina il fattore taglia ma si limita a standardizzarlo per permettere il confronto tra oggetti differenti; la regressione, invece, insieme alle informazioni sulla taglia, distrugge anche parte delle informazioni sulla forma (Gilbert, 2011). Tuttavia, grazie all’esplorazione dello spazio consentita in Morphologika, è comunque possibile individuare l’esistenza di variabilità nella forma e le principali direzioni che la influenzano (Fleagle et al., 2010).

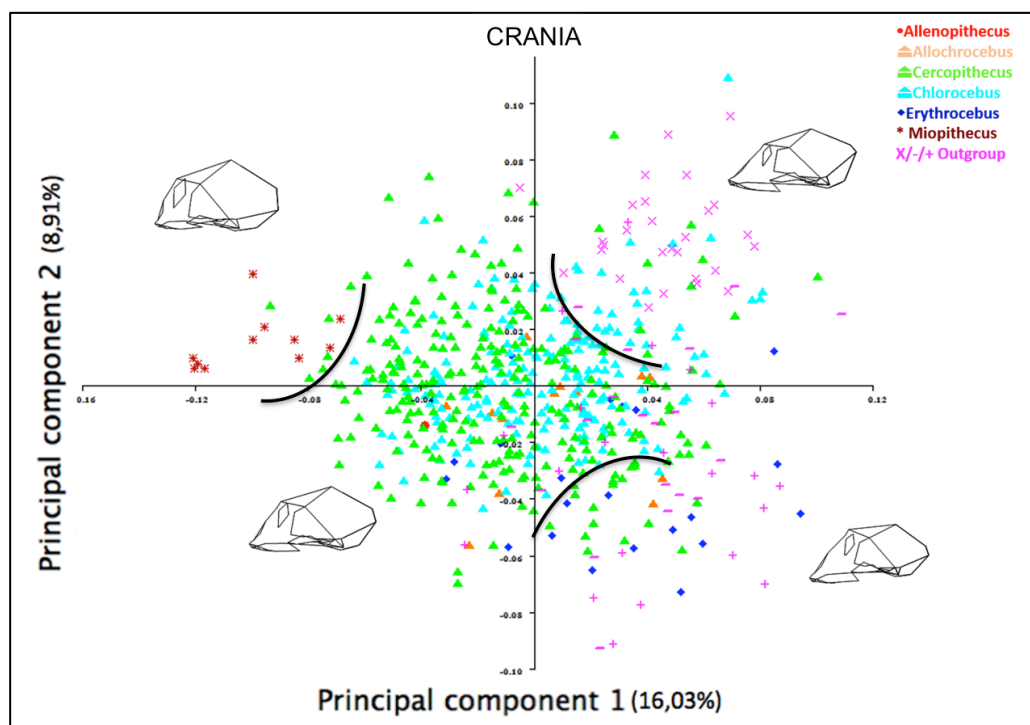


Figura 14. Grafico delle componenti principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma nei crani degli adulti in relazione alla variabile “genere”. I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza mentre le linee nere evidenziano i cluster principali.

In aggiunta al fatto di rappresentare il genere di Catarrhini (*Old World Monkeys*) più piccolo, *Miopithecus* (asterischi porpora) si distingue per la presenza di caratteri neotenici nel cranio: neurocranio alto e globulare (PC2), ampie orbite e splancnocranio corto (PC1). Le sue peculiarità morfometriche lo collocano nella porzione più a sinistra della distribuzione, ben separato dagli altri generi. Prese tutte insieme queste caratteristiche di taglia e forma sembrano indicare una riduzione delle dimensioni precoce e precedente alla separazione dagli altri generi, seguita dalla colonizzazione di una peculiare nicchia ecologica. Infatti, nessun'altra specie di Cercopithecini è caratterizzata da nanismo o tratti neotenici, ragion per cui un destino indipendente può essere perfettamente ipotizzato. Nonostante queste sue peculiari caratteristiche, in passato è stato inserito all'interno dell'ampio genere *Cercopithecus* (Verheyen, 1962), con cui condivide l'habitat forestale e le attitudini prevalentemente arboricole ma, come mostrato, non la morfologia cranica. A destra dei miopiteci si trova un grande cluster centrale, al cui interno si collocano i generi *Cercopithecus* e *Allenopithecus* a sinistra (triangoli verdi e cerchio rosso) e i suoi (presunti) *sister genera* *Chlorocebus* e *Allochrocebus* sulla destra (triangoli turchesi e arancioni). I tre taxa sono caratterizzati da neurocrani ugualmente rotondi, ma gli individui appartenenti agli ultimi due generi presentano un maggiore prognatismo rispetto a quelli del genere *Cercopithecus* (PC1). A differenza dei cercopiteci s.s., clorocebi e allocrocebi sono caratterizzati da attitudini semi-terricole e vivono in ambienti più aperti (margini tra foresta e savana, pianure montane d'alta quota..), in cui i display facciali possono essere adottati in maniera più proficua. Ciò potrebbe aver influenzato la morfologia cranica in risposta a specifiche pressioni ambientali. In questo caso, infatti, la taglia dei tre taxa è confrontabile; tuttavia, graficamente la distinzione non è netta, pertanto anche piccole differenze di taglie potrebbero aver contribuito a differenziare le forme dei crani. Morfometricamente *Chlorocebus* e *Allochrocebus* non rappresentano generi distinti, ma specie nella forma scheletrica affini al genere *Cercopithecus*, differenziatesi come conseguenza di ambienti diversi. Contrariamente a quanto trovato da Verheyen (1962), ma in linea con Cardini & Elton (2008a), *Allenopithecus* (cerchio rosso) si colloca all'interno del cluster *Cercopithecus*. La sua taglia media ricade nel *range* dimensionale mostrato dal clade *Cercopithecus* (Butynski et al., 2013), tuttavia è probabile che il numero ridotto di esemplari campionati non permetta di rendere sufficientemente evidenti le differenze di forma.

Un progressivo sviluppo delle ossa facciali caratterizza la porzione destra del grafico (PC1), dove si trovano il genere *Erythrocebus* (diamanti blu) e gli outgroup (croci, ics e trattini rosa). Entrambi condividono taglie sensibilmente maggiori e un pronunciato restringimento del neurocranio (PC1), ma differiscono per la forma delle ossa frontali e per la posizione del

forame magno (PC2). Nel quadrante superiore destro, gli outgroup *Colobus* (ics) e *Cercocebus* (trattini) mostrano ossa frontali sfuggenti e forami arretrati. In realtà, entrambi i generi sono caratterizzati da un accentuato toro sopraorbitario, ma la presenza della cresta sagittale evidentemente lo maschera nella ricostruzione morfometrica. L'arretramento e l'inclinazione del forame sembrano una conseguenza allometrica dell'allungamento del neurocranio. Infatti, i crani più grandi tendono ad avere forami in posizione più arretrata (Luboga & Wood, 1990). Un'ulteriore conseguenza è l'ampliamento dello spazio disponibile sul neurocranio per collocare inserzioni muscolari più robuste, il che consente l'ampliamento della gamma di cibi disponibili nella dieta.

Sorprendentemente, la posizione del forame non è correlata alle dimensioni e non influenza le attitudini locomotorie delle specie. Un forame arretrato, infatti, normalmente si riscontra nelle specie quadrupedi (Russo & Kirk, 2013) e in quelle di dimensioni maggiori (Luboga & Wood, 1990). Tuttavia, *Erythrocebus patas* è un grande primate principalmente quadrupede, ma presenta il forame in posizione analoga a quella presentata da specie più piccole e con attitudini prevalentemente arboricole (miopiteci e cercopiteci s.s.); *Colobus guereza*, invece, mostra un forame arretrato e inclinato, ma spende la maggior parte del suo tempo sugli alberi. Evidentemente, le attitudini arboricole non implicano un maggiore stazionamento in posizione ortograde di quanto si potrebbe pensare.

Nella parte inferiore dell'asse verticale, i generi *Erythrocebus* (diamanti) e *Macaca* (croci) clusterizzano insieme, dal momento che entrambi presentano musi allungati (PC1) e tori pronunciati senza cresta sagittale (PC2). I due generi sono caratterizzati da attitudini prevalentemente terricole (nonostante all'interno del genere *Macaca* siano presenti molteplici adattamenti); tuttavia, dal punto di vista morfometrico il loro aspetto snello e prognato non sembra essere correlato tanto al tipo di locomozione, quanto piuttosto ad una dieta simile e non basata su alimenti a lunga e intensa masticazione (Isbell, 1998).

Il grafico della PCA concernente i crani (Fig. 14) sembra separare le specie prettamente arboricole (*Miopithecus* e *Cercopithecus*) da quelle semi-terricole (*Chlorocebus* e *Erythrocebus*). Tuttavia, non sono emerse distinzioni morfologiche legate alla vita arboricola o a quella terricola: la distinzione osservata, infatti, è legata principalmente al fattore taglia.

Il grafico delle mandibole può essere suddiviso in tre differenti cluster (Fig. 15): un primo gruppo costituito dagli individui appartenenti al genere *Erythrocebus*, i quali si dispongono nella porzione più a sinistra dell'asse delle x; un cluster centrale comprendente i generi *Chlorocebus*, *Allochrocebus*, *Allenopithecus*, *Miopithecus* e *Cercopithecus* e un terzo

raggruppamento che riunisce la maggior parte degli outgroup analizzati e si colloca nel quadrante in alto a destra.

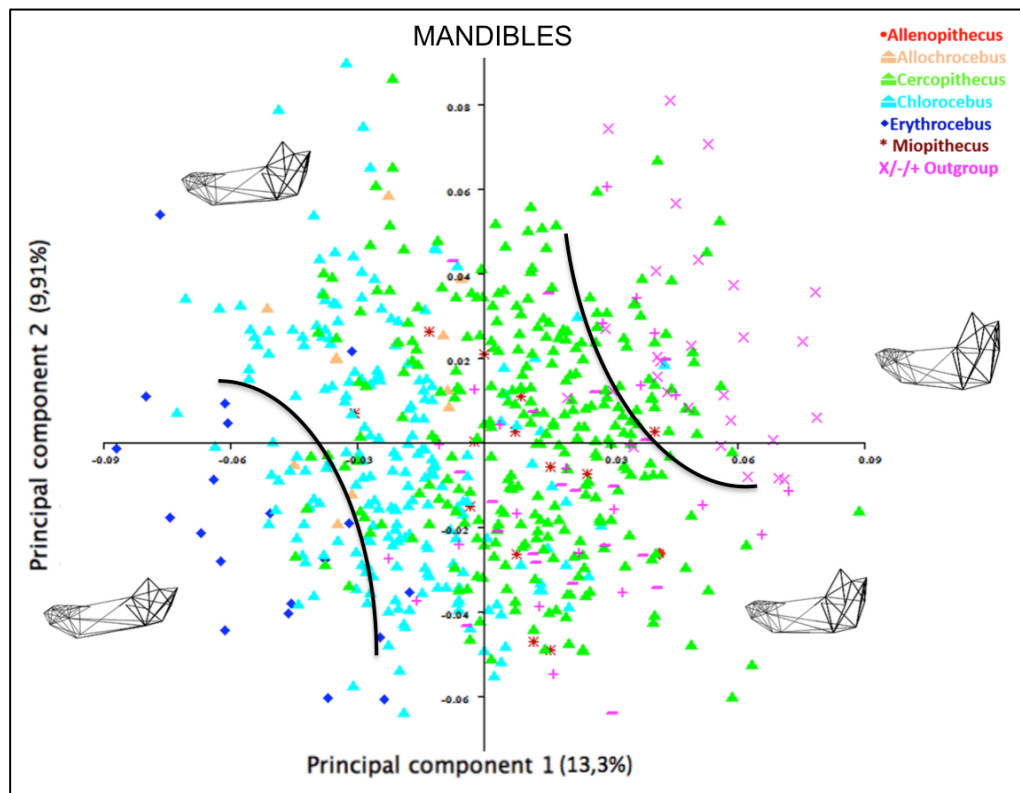


Figura 15. Grafico delle component principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma nelle mandibole degli adulti in relazione alla variabile “genere”. I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza; le line nere evidenziano i cluster principali.

Le differenze più evidenti tra i crani e le mandibole risiedono nell’opposta collocazione delle specie di dimensioni maggiori, nell’inserimento del genere *Miopithecus* all’interno del grande cluster centrale e nella ripartizione più netta dei generi *Chlorocebus* e *Cercopithecus*. Analizzando le differenti forme mandibolari, infatti, il fattore taglia non sembra così preponderante come si era mostrato nel grafico della PCA sui crani (Fig. 14). Le specie di dimensioni maggiori si collocano agli estremi della distribuzione, mentre tutte le altre (piccole e medie) si riuniscono nel grande cluster centrale (Fig. 15). I campioni del genere *Erythrocebus* (diamanti blu) si trovano ben separati rispetto agli altri individui, poiché presentano condili corti (PC2) e corpi mandibolari lunghi (PC1) per adattarsi ai crani allungati osservati in precedenza. Inoltre, l’altezza del corpo mandibolare risulta ridotta, probabilmente per limitare lo svantaggio causato dal fatto che le mandibole sono leve del terzo tipo. Come conseguenza di questo accorciamento, i canini superiori appaiono più lunghi, probabilmente contribuendo alla comunicazione sociale (Fig. 16 a). Tuttavia, quanto più le strutture ossee sono strette, tanto più è limitata l’area per le inserzioni muscolari. *E. patas*, infatti, non sembra caratterizzato da grande forza nel morso o nella triturazione, anche in considerazione della sua

dieta basata su gomma e artropodi (Isbell, 1998). L'esiguo spessore delle mandibole degli eritrocebi giustifica il loro differente collocamento rispetto alle mandibole degli outgroup (croci, ics e trattini rosa) (Fig. 15) che invece si presentano grosse e robuste (Fig. 16 d). Il rapporto tra la lunghezza del corpo mandibolare e l'altezza dei rami risulta maggiore di 1 nel caso degli eritrocebi, mentre lunghezza ed altezza negli outgroup si eguagliano. Il prognatismo mostrato dai crani di *Erythrocebus* e degli outgroup (Fig. 14) sembrano entrambi correlati ad un incremento dimensionale, ma solo nel caso degli outgroup questo incremento ha portato ad un incremento anche dei corpi mandibolari (Fig. 16 a, d). Spostandosi verso destra nel grafico della PCA mandibolare, si trova il cluster centrale: a sinistra è costituito da *Chlorocebus* e *Allochrocebus* (triangoli turchesi e arancioni), mentre a destra da *Cercopithecus* (triangoli verdi), *Miopithecus* (asterischi porpora) e *Allenopithecus* (cerchio rosso) (Fig. 15). Poiché la ripartizione delle mandibole di *Chlorocebus* e *Cercopithecus* appare più netta rispetto a quella mostrata dai crani, i due taxa sembrano differire principalmente nei pattern masticatori (Fig. 16 b, c).

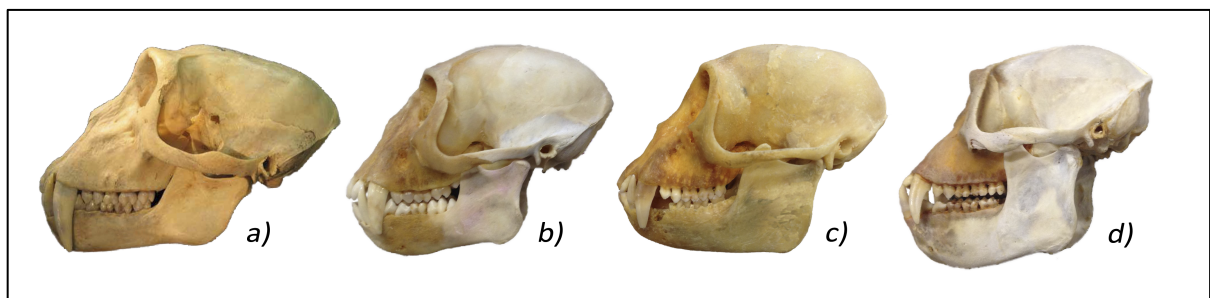


Figura 16. Norma laterale sinistra di quattro crani di Cercopithecidae:
a) *Erythrocebus patas*, b) *Chlorocebus aethiops*, c) *Cercopithecus nictitans* e d) *Colobus guereza*.

Le mandibole dei clorocebi presentano un corpo più corto (PC1) e più alto (PC2) rispetto a quello degli eritrocebi (Fig. 16 a, b), offrendo una superficie maggiore su cui inserire i muscoli masticatori. Infatti, i clorocebi presentano una dieta più varia rispetto agli eritrocebi, in accordo con l'ampia varietà di habitat che occupano (Butynski et al., 2013). I campioni di *Allochrocebus* non si differenziano da quelli di *Chlorocebus*, presentando entrambi lo stesso rapporto lunghezza-altezza. Le mandibole di *Cercopithecus*, invece, mostrano rami e condili (PC2) progressivamente più lunghi rispetto a quelli dei clorocebi (Fig. 16 b, c). Queste strutture alloggiano le inserzioni per i muscoli della masticazione, che di conseguenza dovrebbero essere più ampie nei cercopiteci s.s. Infatti, rispetto ai clorocebi, i cercopiteci s.s. sono animali principalmente arboricoli e onnivori che si nutrono in prevalenza di frutti e materiale vegetale (Chapman et al., 2002), grazie ad un complesso masticatorio sufficientemente potente. Il ridotto prognatismo facciale dei cercopiteci, funzione delle loro

dimensioni inferiori, rappresenta un vantaggio per lo stile di vita prettamente arboricolo, poiché muscoli più corti e visione binoculare favoriscono i movimenti tra gli alberi. Come conseguenza di un'evoluzione arboricola, i cercopiteci s.s. mostrano pattern facciali estremamente colorati e vocalizzazioni intense (Kingdon, 1988b; Allen et al., 2014), a discapito dell'espressioni facciali scarsamente visibili tra il fogliame. La variabilità facciale dei cercopiteci non si basa su differenze scheletriche, come dimostrato dall'ampia uniformità morfometrica riscontrata. Inoltre, nonostante la presenza di un pattern più evidente per quanto riguarda le mandibole, come già osservato per i crani le differenze esistenti non sembrano giustificare l'indipendenza dei taxa *Chlorocebus* e *Allochrocebus*. Difatti, le differenze osservate sembrano dettate principalmente da specifiche pressioni ecologiche che da reale distanza filogenetica.

Al contrario dei crani, le mandibole di *Miopithecus* ricadono all'interno del gruppo *Cercopithecus*. Ciò potrebbe essere dovuto all'assenza di caratteri neotenici nelle mandibole e/o alle similitudini nell'alimentazione forestale che hanno portato all'evoluzione di strutture mandibolari simili. Invece, in linea con quanto osservato nel grafico della PCA craniale, la mandibola di *Allenopithecus* ricade all'interno del grande gruppo centrale. La mancanza di clusterizzazione osservata anche stavolta, quasi sicuramente, è correlata alla scarsità di individui campionati e non all'assenza di differenze tra i due generi (Fig. 17 a, b).

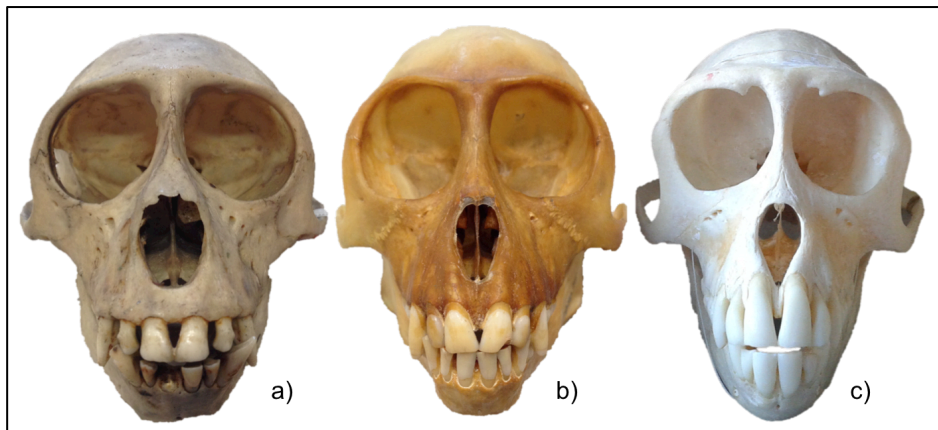


Figura 17. Norma frontale dei crani di a) *Cercopithecus pogonias*, b) *Allenopithecus nigroviridis* e c) *Macaca fascicularis*.

La porzione in alto a destra della distribuzione mandibolare è occupata dagli outgroup (Fig. 15). Essi presentano rami più lunghi (PC2) e corpi mandibolari più corti ma più robusti (PC1), in relazione alla loro maggiore taglia e ad un'intensa masticazione. In particolar modo, i colobi presentano strutture masticatorie molto robuste (Fig. 16 d), per sostenere un'alimentazione principalmente folivora (Harris & Chapman, 2007).

Dal momento che il fattore taglia non sembra implicato nella distribuzione delle mandibole, si potrebbe ipotizzare che le differenze riscontrate siano conseguenza diretta delle abitudini locomotorie ed alimentari: maggiormente da terricoli nei gruppi a sinistra (*Erythrocebus*, *Chlorocebus* e *Allochrocebus*), maggiormente arboricole nei gruppi a destra (*Miopithecus*, *Allenopithecus*, *Cercopithecus* e outgroup). Tuttavia, come già osservato per i crani, non sussistono elementi morfometrici che indichino una ripartizione del gruppo in specie arboricole e terricole. I caratteri identificati in studi precedenti, infatti, non sembrano trovare riscontro nel nostro studio: le orbite ampie caratteristiche dei cercopiteci terricoli (Ravi et al., 2013) raggiungono il loro massimo negli arboricoli miopiteci, mentre la lunghezza basicraniale che dovrebbe essere maggiore nelle specie arboricole (Ravi et al., 2013) ha valori più alti nei semi-terricoli eritrocebi.

L'evidente influenza della taglia sulla forma è confermata anche dalle analisi della covarianza effettuate (regressione). La taglia influenza il 34.50% della forma dei crani e il 15.40% della forma delle mandibole. Questi valori, però, scendono rispettivamente al 14.53% e al 2.17% se si considerano solamente gli adulti. Il basso valore registrato per le mandibole non sorprende, considerata l'opposta collocazione delle specie di maggiore dimensione nel grafico della PCA mandibolare (Fig. 15). Inoltre, il cranio dei maschi è maggiormente soggetto alle variazioni di taglia (38.70%) rispetto a quello delle femmine (28.77%) se si considerano anche gli infanti e i giovani nelle analisi. Le mandibole, invece, sono meno influenzate dalla taglia e le differenze sessuali sono minime (M: 15.67% e F: 14.35%). Negli adulti, la taglia determina una ridotta componente della forma e non è condizionata dal sesso (Crani. M: 13.82% – F: 11.98%; Mandibole. M: 1,64% – F: 2.12%), ad indicare che le differenze dimensionali influenzano in modo analogo le forme dei due sessi. L'analisi della regressione è stata effettuata, nonostante i limiti di questa tecnica precedentemente citati. I residui della regressione sono stati utilizzati per effettuare nuove analisi delle componenti principali e i risultati della PCA pre- e post-regressione sono stati cautamente confrontati. Tuttavia, nessuna differenza significativa è emersa dalle indagini, pertanto i residui non sono stati più utilizzati.

Per quanto riguarda la variabile “specie” sui campioni adulti, non è emerso nessun chiaro pattern di distribuzione, mentre un'adeguata clusterizzazione è stata ottenuta, invece, con la variabile “sesso” (Fig. 18). Le femmine sono caratterizzate da neurocrani larghi (PC2) e facce poco prognate (PC1), mentre i maschi presentano crani più allungati (PC1) ma ugualmente arrotondati (PC2). L'accentuato prognatismo maschile può essere spiegato con la loro taglia maggiore, cui segue il restringimento del neurocranio. Come conseguenza, i canini aumentano di dimensione e inserzioni muscolari più forti possono essere alloggiati. Allo stesso modo, le

mandibole maschili appaiono più allungate di quelle femminili (PC1), in accordo con la forma dei rispettivi crani. Tuttavia, il pattern di clusterizzazione mandibolare è meno evidente, probabilmente a causa di una comparabile altezza dei condili (PC2) e di fattori che non sono stati presi in considerazioni, come la taglia dei denti, ma che rivestono un ruolo importante nella discriminazione sessuale. Anche negli outgroup è presente una ripartizione in sessi (ics rosa e celesti), che risulta però meno accentuata.

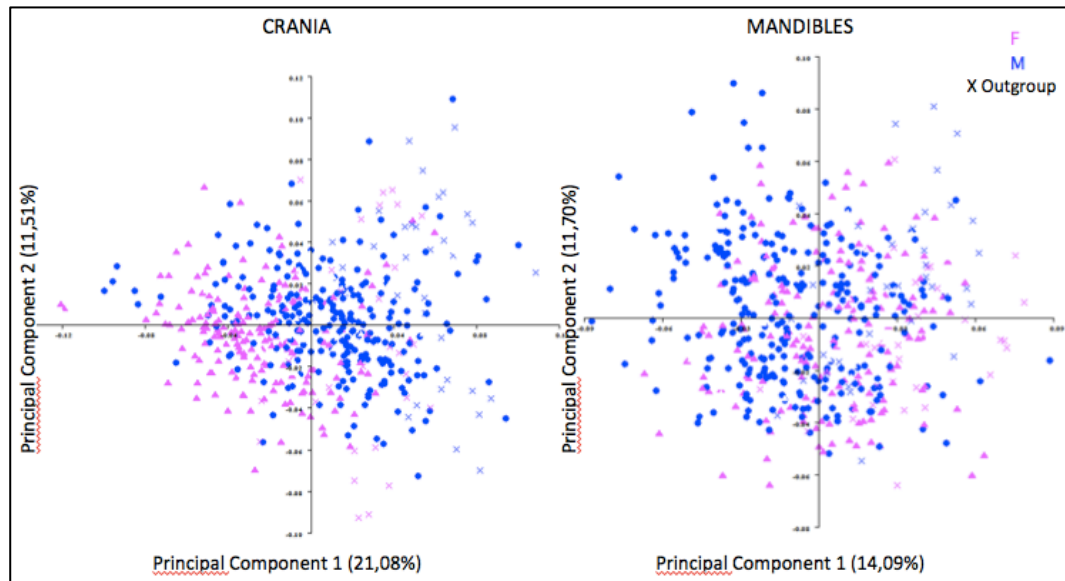


Figura 18. Grafico delle component principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma negli adulti campionati, in relazione alla variabile “sesso”. I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza.

Successivamente, sono stati analizzati i sottoinsiemi “*Cercopithecus*”, con l’obiettivo di ottenere una clusterizzazione di livello specifico. Tuttavia, le variabili investigate sugli individui adulti (“specie”, “species groups” e “geolocalizzazione”) non hanno permesso di ricavare alcun pattern coerente all’interno del genere. Studi precedenti hanno testato la correlazione tra le posizioni assunte dai cercopiteci e le loro abitudini alimentari (Fleagle, 1985; McGraw, 2002). Ad esempio, *C. diana* (cerchi rossi) è la specie più insettivora e contemporaneamente quella che sta meno in posizione seduta; al contrario *C. petaurista* (cerchi verdi) è la specie meno insettivora e quella che sta maggiormente seduta (McGraw, 2002) (Fig. 19). Tuttavia, nonostante l’uso di determinate posizioni e le abitudini alimentari possano influenzare la conformazione del cranio, tali differenze non si evincono nelle nostre indagini morfometriche. Inoltre, questa correlazione non sembra universalmente valida: *albogularis* (rosso) e *mitis* (verde) condividono ecologia, dieta e pattern di locomozione, ma non conformazione cranica (Fig. 19). Il debole pattern lungo la PC2 pertanto, non corrisponde ad alcun raggruppamento ecologico-locomotorio per le specie prese in esame.

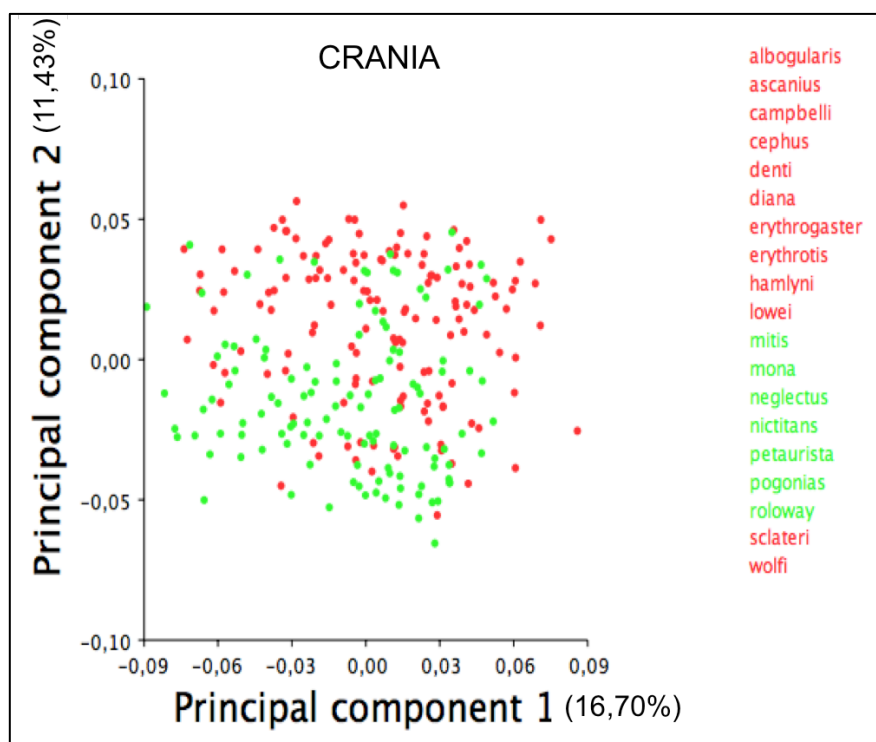


Figura 19. Grafico delle component principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma nei campioni di *Cercopithecus* relativa alla variabile "specie". I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza.

Inoltre, è stata effettuata un'analisi delle componenti principali (PCA) sulle forme medie dei campioni adulti, al fine di ottenere una migliore clusterizzazione dei generi (Fig. 20) e delle specie. Le forme medie relative ai generi parzialmente confermano i precedenti risultati di PCA (Fig. 14 e 15). Le due analisi differiscono unicamente nella collocazione di *Allenopithecus*, il quale nei due grafici delle forme medie si colloca ben separato rispetto agli altri (in basso al centro nel grafico dei crani e in alto a sinistra nel grafico delle mandibole) (Fig. 20). Una possibile spiegazione potrebbe scaturire dal fatto che l'analisi delle forme medie compara singoli valori, annullando così le differenze di campionamento. Emergono, dunque, indizi a favore di una peculiare forma cranica per *Allenopithecus*, distinta sia da quella dei cercopiteci s.l. che degli outgroup. Il dato è molto interessante, per la posizione ancestrale del cercopiteco di palude nelle ricostruzioni filogenetiche dei Cercopithecini (Disotell & Raaum, 2002; Tosi et al., 2004; 2005; Perelman et al., 2011) e per i dubbi che sono stati sollevati in passato sulla sua appartenenza alla tribù Papionini (Groves, 1989). Tuttavia, il basso numero di campioni non permette di aggiungere informazioni supplementari alla discussione. L'analisi delle forme medie relative alle differenti specie, invece, ha confermato l'assenza di pattern che già era stata riportata per la PCA sui singoli campioni.

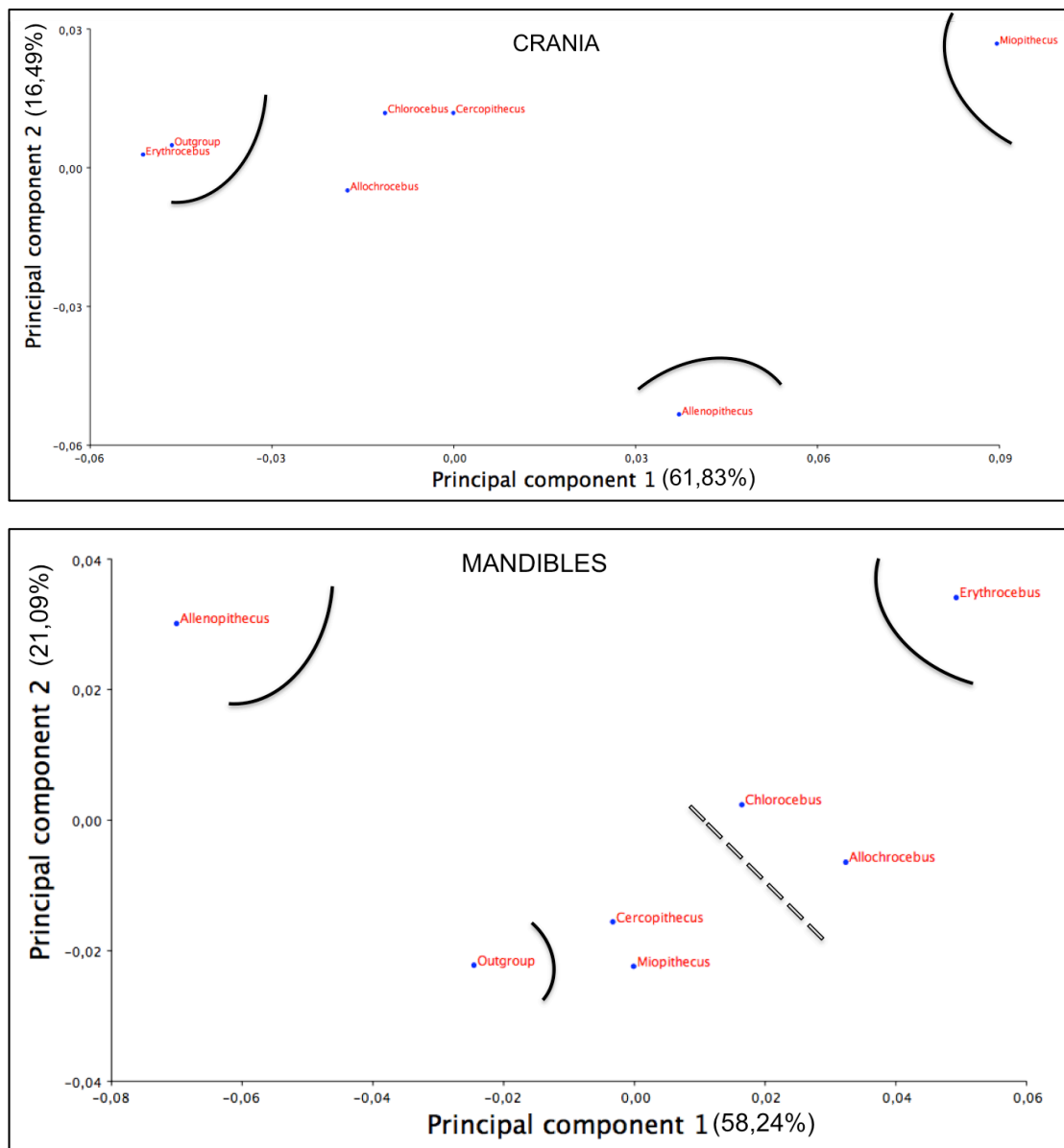


Figura 20. Grafico delle component principali 1 e 2 (PC1 e PC2) che mostra la variabilità della forma media negli adulti campionati. I numeri in parentesi si riferiscono alle percentuali di varianza mentre le line nere evidenziano i cluster principali.

In ultimo, è stata testata la presenza di un segnale filogenetico nei dati morfometrici, mappando in MorphoJ le variazioni di forma tra i taxa su due alberi molecolari ricavati dalla letteratura (Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013). Da questi alberi, ne sono stati ricavati due morfometrici: il primo è stato ottenuto partendo dai dati nucleari (Perelman et al., 2011) (Fig. 21), mentre il secondo da sequenze mitocondriali (Guschanski et al., 2013) (Fig. 22).

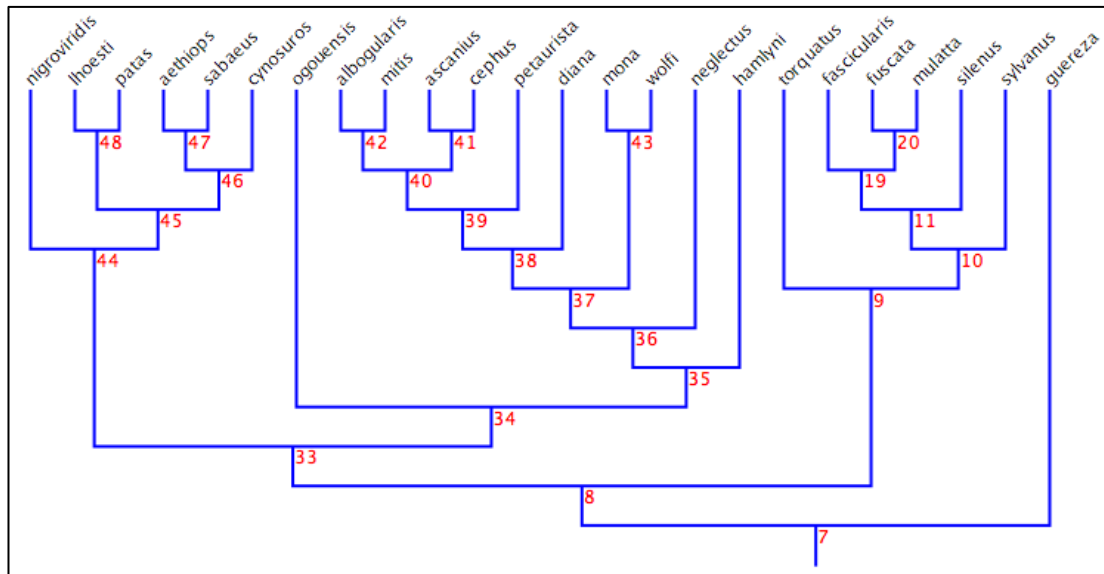


Figura 21. Albero costruito mappando i dati morfometrici sui dati nucleari (Perelman et al., 2011).
I numeri in rosso si riferiscono ai nodi interni che non hanno etichetta (Klingenberg, 2011), ma non presentano un significato statistico.

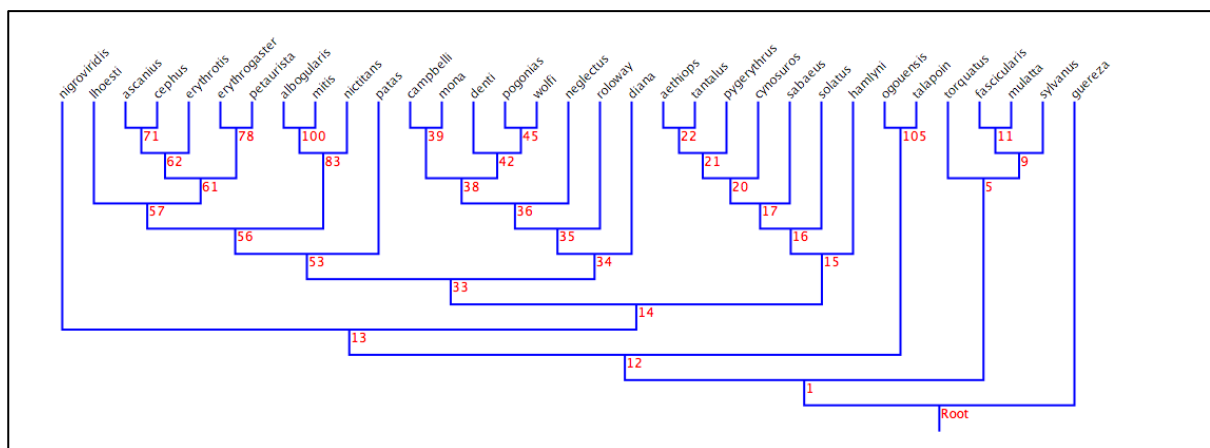


Figura 22. Albero costruito mappando i dati morfometrici sui dati mitocondriali (Guschanski et al., 2013).
I numeri in rosso si riferiscono ai nodi interni che non hanno etichetta (Klingenberg, 2011), ma non presentano un significato statistico.

Nell'albero nucleare *A. nigroviridis* e *M. talapoin* rappresentano le specie alla base dei cosiddetti cladi “terricolo” e “arboricolo” (Fig. 21). In quello mitocondriale, invece, il genere *Miopithecus* è il più ancestrale e *Allenopithecus* compare successivamente, del precedente clade terricolo rimangono *lhoesti* e *patas* insieme a specie prevalentemente arboricole del genere *Cercopithecus*, mentre il gruppo *aethiops* clusterizza insieme a *solatus* appartenente al gruppo *lhoesti* (Fig. 22). Entrambi gli alberi presentano valori significativi (p-value Tree_Perelman: 0.0006; p-value Tree_Guschanski: $p < .0001$) indicando l'esistenza di un segnale filogenetico all'interno dei dati morfometrici. Tuttavia, le differenze presenti negli alberi molecolari di partenza non permettono di giungere a conclusioni filogenetiche affidabili e univoche a partire dai dati morfometrici. Per tale motivo, le medie delle coordinate procruste dei crani e delle mandibole degli adulti (già sottoposte alla standardizzazione della taglia

tramite GPA) sono state inserite nel programma Past e due analisi multivariate sono state effettuate: Classical (UPGMA) e Neighbour Joining. Nonostante gli indici di correlazione cofenetica (C) per le analisi UPGMA presentino valori molto elevati (da 0.93 a 0.98) ad indicare bassi livelli di distorsione dalle distanze originali, né i crani né le mandibole mostrano una clusterizzazione comparabile con quelle ottenute dalle PCA effettuate e dagli alberi molecolari tratti dalla letteratura (Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013) (Fig. 23, in alto). Gli outgroup non sono distinti dai cercopiteci né i cercopiteci stessi si raggruppano in maniera coerente.

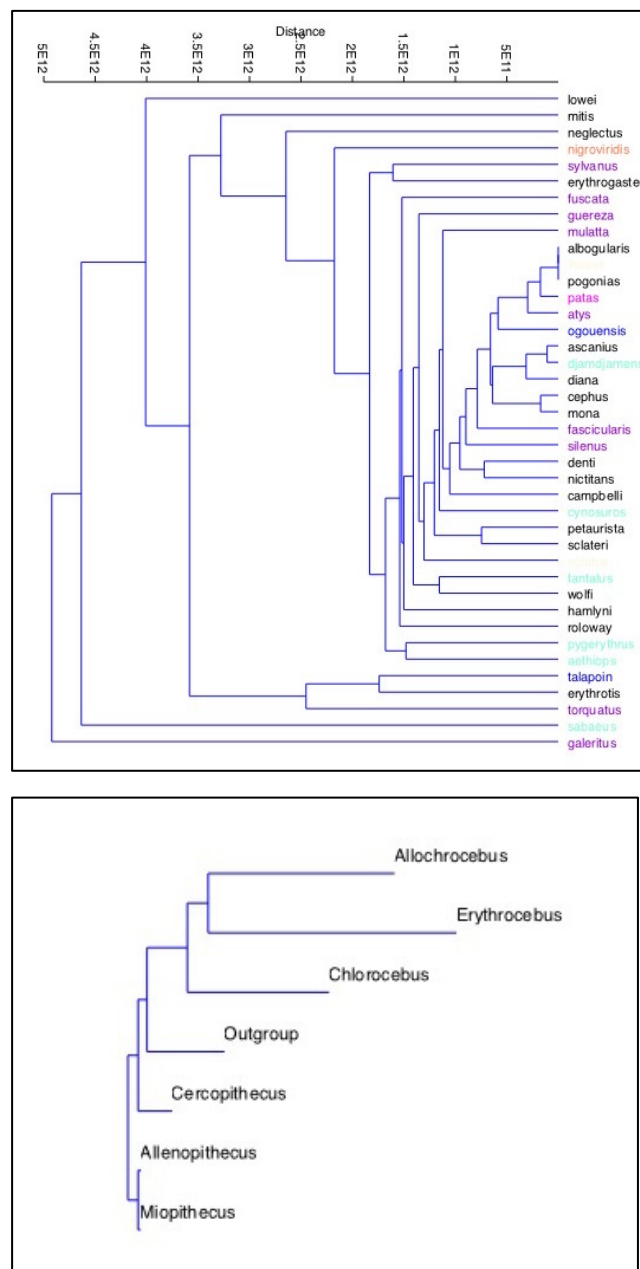


Figura 23. In alto, fenogramma delle medie dei crani adulti, suddivisi per specie e colorati per generi, ottenuto tramite UPGMA (C: 0.93). In basso, fenogramma delle medie delle mandibole adulte, suddivise per generi, ottenuto tramite Neighbour Joining.

Inoltre, nessun riscontro positivo è emerso in seguito all'analisi Neighbour Joining (Fig. 23, in basso), ad indicare la natura conservativa delle strutture ossee all'interno della tribù Cercopithecini. Considerata l'elevata vicinanza tassonomica tra le specie, infatti, non sorprende l'assenza di una distinzione morfometrica. La loro recente storia evolutiva e l'ecologia simile hanno sicuramente condizionato l'evoluzione dei distretti scheletrici, che difatti mostrano bassi tassi di mutazione.

3.2 LA CITOGENETICA

La specie scelta per iniziare la fase di analisi citogenetica è stata *Cercopithecus petaurista* (CPE), un cercopiteco s.s. del gruppo *cephus* con numero diploide pari a 66. I vetrini in possesso con metafasi di CPE sono stati inizialmente sottoposti a bandeggio G (Fig. 24, a sinistra) e, successivamente, i cromosomi sono stati ordinati sulla base delle disposizioni stabilite per i cromosomi umani (Mitelman, 1995) (Fig. 24, a destra).



Fig. 24. A sinistra, metafase di *C. petaurista* (CPE) con bandeggio G. A destra, cariotipo di CPE ricostruito.

In alto sono stati disposti i cromosomi metacentrici con dimensioni via via decrescenti e, a seguire, i sub-metacentrici e gli acrocentrici. I cromosomi sessuali sono stati posizionati separatamente rispetto agli altri, in basso a destra. I 66 cromosomi di *Cercopithecus petaurista* (32 coppie di autosomi più 2 cromosomi sessuali) si dividono in coppie di 4 metacentrici di medie dimensioni, 6 di sub-metacentrici di grandi dimensioni, 13 di sub-metacentrici di medie dimensioni e 9 di acrocentrici di formato ridotto. Il cromosoma X è un sub-metacentrico di grande dimensione, mentre l'Y è un acrocentrico puntiforme (Fig. 24, a destra). La numerazione comunemente in uso per il cariotipo umano (Mitelman, 1995) non è stata applicata alla specie in esame sia per il differente numero diploide, sia perché la morfologia dei cromosomi non si è conservata inalterata nei due *taxa* considerati. In seguito, sono stati effettuati i bandeggi G sulle altre specie oggetto di indagine e i bandeggi Ag-NOR e C su tutte le specie analizzate (Fig. 25 e 26), al fine di individuare eventuali variazioni nei singoli cromosomi, nelle regioni organizzatrici del nucleolo (NORs) (Fig. 25, a sinistra) e nella componente eterocromatica (Fig. 26, a destra). Nell'uomo, normalmente, i NORs sono localizzati su cinque cromosomi acrocentrici (13, 14, 15, 21 e 22) (Babu & Verma, 1985), ma la frequenza di ritrovamento sul cromosoma 22 è bassa (Mikelsaar et al., 1977). In Figura 25

(a sinistra), il segnale si presenta chiaramente su tre coppie di cromosomi e su due cromosomi singoli. Infatti, non tutti e dieci i cromosomi normalmente si colorano (Guilléen et al., 2004). In *Macaca* e nei Cercopithecini, così come in tutte le altre Cercopithecidae, il NOR si distribuisce unicamente su una coppia di cromosomi omologhi (Stanyon et al., 1995) che nel cariotipo umano corrisponde all'HSA22 (Stanyon et al., 2005).

Come si può osservare, il cromosoma Y è costituito quasi unicamente da eterocromatina non codificante (Fig. 25, a destra). Variazioni nell'eterocromatina pericentromerica sono state evidenziate sia in *Macaca* (Fig. 25, a destra) che nei cercopiteci (Fig. 26, a destra).

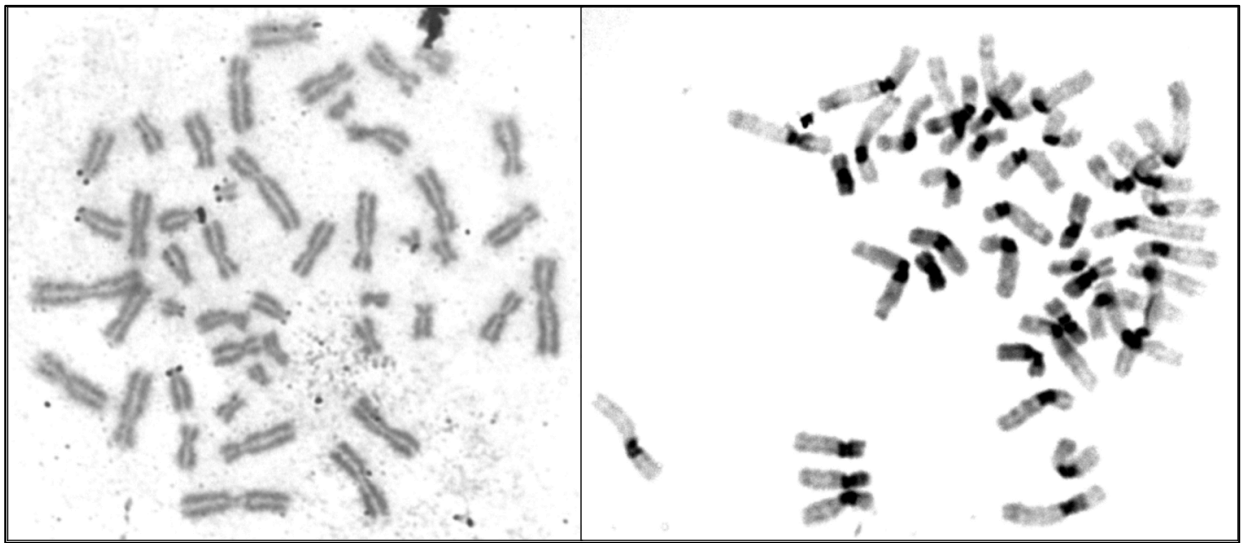


Figura 25. A sinistra, metafase di *Homo sapiens* con bandeggio Ag-NOR; a destra, metafase di *Macaca sylvanus* con bandeggio C.

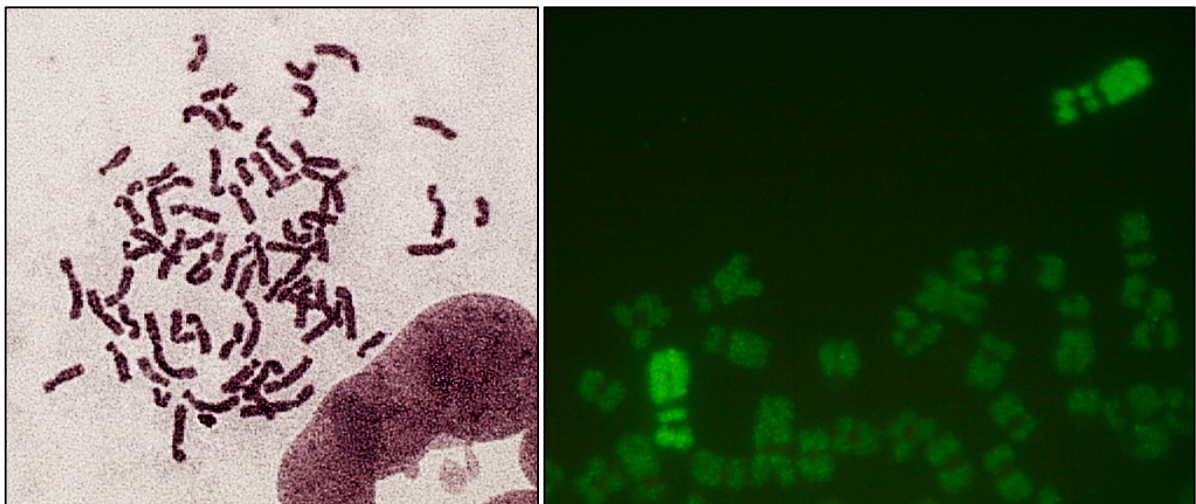


Figura 26. A sinistra, metafase di *patas* (EPA) con bandeggio G; a destra, metafase non completa di CPE con l'eterocromatina pericentromerica sull'omologo di HSA7 in evidenza.

Dopo aver effettuato i bandeggi, sono stati ricostruiti i cariotipi delle rimanenti specie. *C. mitis* presenta un cariotipo con 72 cromosomi, di cui 6 coppie di metacentriche di medie dimensioni,

4 di sub-metacentrici di grandi dimensioni, 10 di sub-metacentrici di medie dimensioni, 4 di sub-metacentrici di piccole dimensioni, 2 di acrocentrici di medie dimensioni, e 9 coppie di acrocentrici di formato ridotto. Analogamente a *petaurista*, il cromosoma X è un sub-metacentrico di grandi dimensioni, mentre l'Y è un acrocentrico puntiforme. *C. aethiops* presenta un numero diploide inferiore ($2n = 60$), in cui le 29 coppie cromosomiche autosomali si suddividono in 6 metacentrici di medie dimensioni, 7 sub-metacentrici di grandi dimensioni, 6 sub-metacentrici di medie dimensioni, 6 acrocentrici di grandi dimensioni e 4 acrocentrici di dimensioni inferiori. I cromosomi sessuali non si discostano da quelli degli altri cercopiteci analizzati. I cariotipi di *M. sylvanus* ($2n = 42$) e *Homo sapiens* ($2n = 46$), nonostante differiscano nel numero diploide, si presentano simili ad indicare un basso livello di *reshuffling* genomico dalla loro divergenza ad oggi (Wienberg & Stanyon, 1998). In ultimo, il cariotipo di *Erythrocebus patas* ($2n = 54$) presenta un maggior numero di sub-metacentrici rispetto al numero di acrocentrici (soltanto 6 coppie) (Fig. 26, a sinistra). Ciò è in accordo con la teoria del Numero Fondamentale, secondo la quale le specie con alto numero cromosomico mostrano una maggiore percentuale di acrocentrici, mentre le specie con basso numero diploide sono caratterizzate dalla predominanza di metacentrici e sub-metacentrici (Matthey, 1949; Stanyon & Sineo, 1983).

In seguito, con il bandeggio G è stato possibile notare che una delle coppie di cromosomi omologhi di *mitis* (CMI) si presenta eterozigotica nella posizione del centromero (Fig. 27, a sinistra). In una delle coppie di cromosomi di *petaurista* (CPE), invece, non è chiaro se sia avvenuto uno spostamento (*shift*) del vecchio centromero in una nuova posizione o si sia attivato un centromero extra in aggiunta a quello già funzionante (Fig. 27, a destra). Queste scoperte dimostrano quanto variabile sia la componente cromosomica della tribù dei Cercopithecini. Non sono state evidenziate analoghe variazioni nei cariotipi di *Erythrocebus*, *C. aethiops*, *Macaca* e *Homo*. Per quanto riguarda i bandeggi C e Ag-NOR, non è apparsa nessuna differenza nei cariotipi delle specie analizzate, ad eccezione delle variazioni nell'eterocromatina pericentromerica che però non sono legate a particolari snodi evolutivi.



Figura 27. A sinistra, coppia di cromosomi omologhi di *C. mitis* eterozigotica per la posizione del centromero; a destra, coppia di cromosomi di *C. petaurista* con un centromero extra su uno dei due omologhi o uno *shift* del vecchio centromero.

Pertanto, concluse le operazioni di bandeggio, sono state effettuate le procedure per l'ibridazione fluorescente (FISH) – e il conseguente *painting* cromosomico – con sonde umane (HSA) e metafasi di primate. Nonostante sarebbe molto utile poter effettuare un confronto incrociato (con sonde di primate e metafasi umane), il reperimento di sonde non-umane risulta difficoltoso ed eccessivamente costoso, pertanto non è stato eseguito. Le sonde umane utilizzate sono cromosomi interi, dall'1 al 22 (tutti gli autosomi) più il cromosoma sessuale X. L'unico escluso – il cromosoma sessuale Y – non è stato inserito nello studio a causa delle sue dimensioni ridotte e dell'elevata componente eterocromatica terminale (Stanyon et al., 2008) (Fig. 24 e 25, a destra). Per quanto riguarda i risultati delle ibridazioni, pur avendo ottenuto riscontri significativi con tutte le specie, le immagini più nitide sono state ottenute con le metafasi di *C. petaurista*. Pertanto, si è scelto di mostrare prevalentemente immagini di questa specie, per garantire una migliore comprensione dei riarrangiamenti cromosomici.

Dal punto di vista metodologico, l'ibridazione diretta rispetto a quella indiretta è più veloce e permette di saltare dei passaggi, riducendo il rischio di errori nella procedura e diminuendo il numero di variabili coinvolte. Tuttavia, la biotina ha il vantaggio di essere più sensibile e di legarsi più saldamente alle molecole antigeniche; inoltre, poiché la fluorescenza va incontro a decadenza col tempo, i fluorocromi coniugati direttamente con le sonde corrono il rischio di essere maggiormente esposti a sorgenti luminose e, quindi, più soggetti al fenomeno del *photobleaching* (i.e.: diminuzione della fluorescenza) (Song et al., 1995). Considerati i pro e i contro e il fatto di possedere un ugual numero di sonde biotinilate e di sonde già marcate con fluorocromi, si è deciso di adoperare entrambe le metodologie. Il risultato finale, peraltro, non è stato minimamente alterato dalla tipologia di metodica scelta. Una volta messo a punto il protocollo, infatti, è stato appurato che gli esiti sono assolutamente equivalenti.

In Figura 28, sono mostrate le tre colorazioni adoperate sulla stessa metafase: DAPI (in alto), FITC (al centro) e rodamina (in basso). Come si può notare, il filtro per il FITC (al centro) presenta un'ampia lunghezza d'onda e permette di osservare anche il segnale emesso dalla rodamina (in basso), ma non viceversa. I segnali di ibridazione si manifestano sempre sui due cromosomi omologhi.

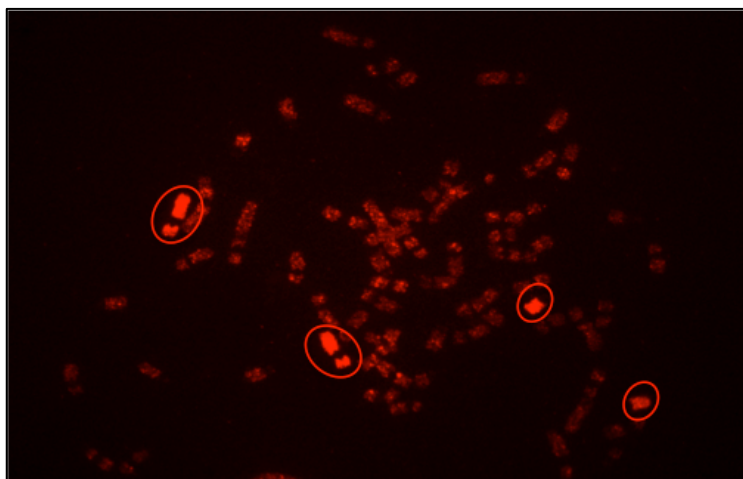
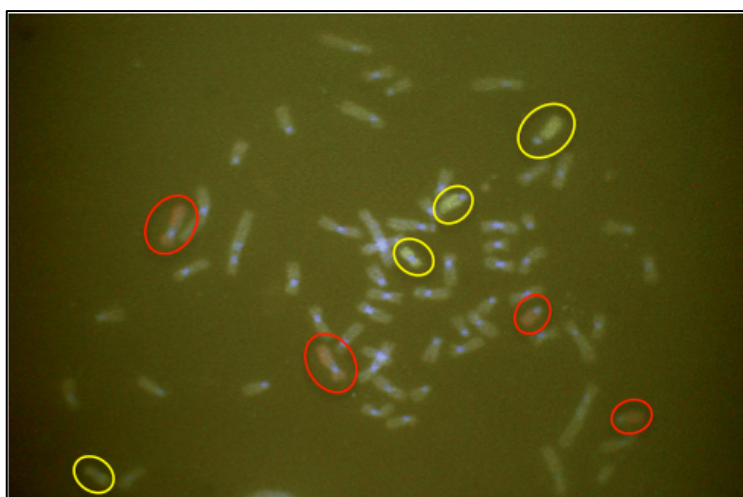
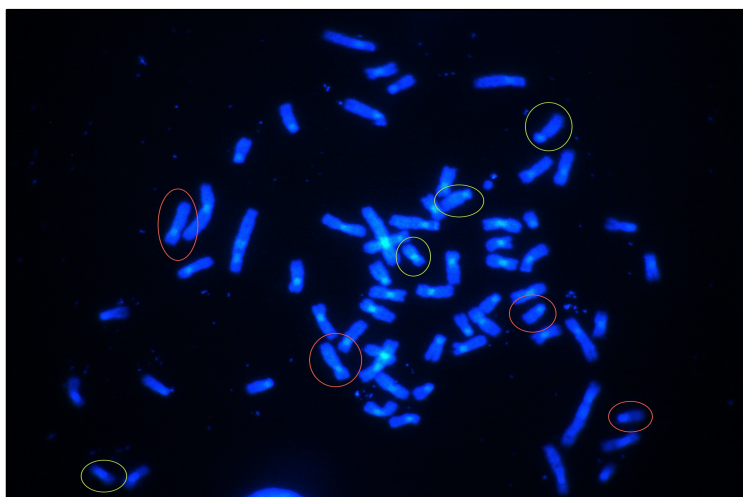


Figura 28. Metafase di *petaurista* (CPE). In alto, colorazione con DAPI; al centro, ibridazione con sonda HSA12 (verde) e HSA6 (rosso); in basso, ibridazione con sonda HSA6 (rosso). I cerchi evidenziano i segnali di ibridazione.

Sulla base dei segnali di ibridazione ottenuti, è possibile affermare che tutti i cromosomi umani presentano porzioni omologhe ai cromosomi dei primati. I cromosomi umani di grandi dimensioni ibridano più di due cromosomi omologhi di primate (Fig. 29), mentre i metacentrici e gli acrocentrici di dimensioni ridotte hanno un unico corrispondente nel cariotipo delle specie analizzate (Fig. 30).

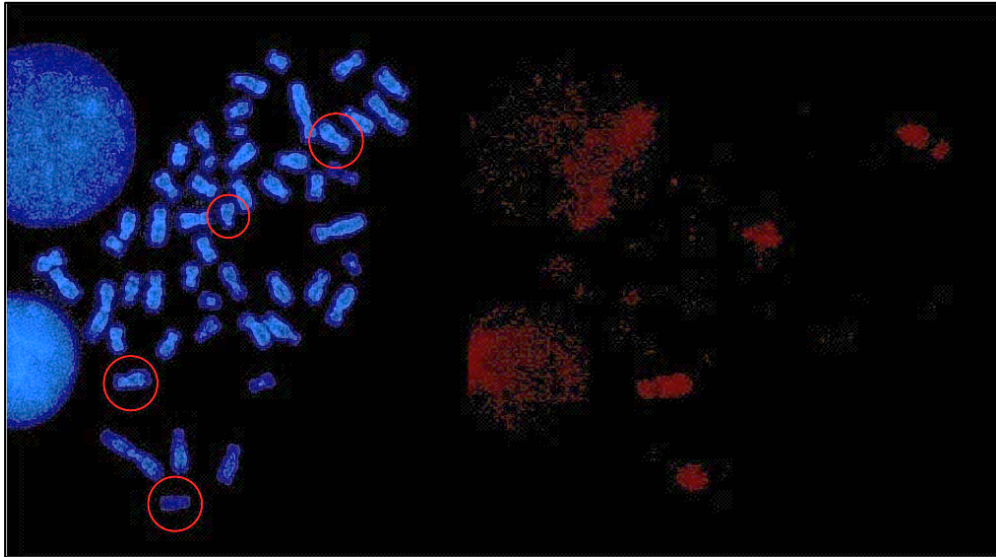


Figura 29. Ibridazione di HSA12 su metafasi di EPA.

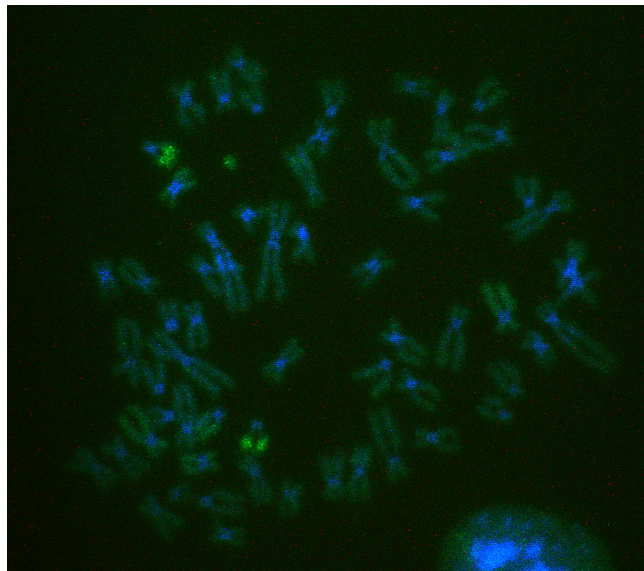


Figura 30. Sonda HSA22 su metafasi di CPE.

In 20 sonde su 23, il segnale si è distribuito sull'intero cromosoma dei cercopiteci, ad esclusione della regione centromerica che, essendo costituita da eterocromatina non ricombinante, non si lega a nessuna porzione umana e, pertanto, non si colora (Fig. 28, in basso). Gli unici cromosomi che si distribuiscono solamente su una porzione del cromosoma di primate corrispondente sono rappresentati dai cromosomi umani (HSA) 22, 20 e 21 (Fig. 30,

31 e 32). HSA22, nonostante nella nomenclatura presenti il numero inferiore, non è il cromosoma umano di dimensioni minori, poiché HSA21 è più piccolo (Dunham et al., 1999; Hattori et al., 2000). Entrambi sono cromosomi acrocentrici, mentre HSA20 è un submetacentrico di dimensioni maggiori di quelle degli altri due cromosomi (Mitelman, 1995; Deloukas et al., 2001). Tutti e tre questi cromosomi nell'uomo si mostrano più piccoli dei corrispondenti cromosomi di primate, infatti, ibridano soltanto una porzione del corrispondente cromosoma non-umano: HSA22 e HSA20 ibridano soltanto il braccio lungo (q) (Fig. 30 e 31, in alto a sinistra) mentre HSA21 quello corto (p) (anche se esistono delle eccezioni) (Fig. 31, in alto a destra).

I Cercopithecini analizzati non presentano le sintenie caratterizzanti il cariotipo dell'uomo, come la fusione del cromosoma 2 (Ijdo et al., 1991; Stanyon et al., 2008) che, di fatti, si distribuisce su tre differenti cromosomi. La separazione delle due superfamiglie (Cercopithecoidea e Hominoidea) è stata collocata a circa 30 milioni di anni fa (Chatterjee et al., 2009), certamente molto prima che l'HSA2 si originasse per fusione (De Pontbriand et al., 2002), pochi milioni di anni fa (Ijdo et al., 1991). Per contro, i membri della tribù possiedono almeno una peculiarità che non sembra condivisa da nessun altro taxon, nemmeno dai loro parenti Papionini: la sintenia dei cromosomi umani 20 e 21 (Stanyon et al., 2008) (Fig. 31, 32 e 33). Nell'uomo, infatti, HSA20 e HSA21 si presentano come entità distinte, mentre nei Cercopithecini non esistono due cromosomi separati, ma un unico cromosoma submetacentrico di medie dimensioni. La sintenia è stata riscontrata in tutte le specie di Cercopithecini analizzate e, come ci aspettavamo, non è emersa dalle indagini sul cariotipo di *Macaca*. Poiché le specie che costituiscono la tribù sono le uniche finora scoperte a presentare tale sintenia, l'evento di fusione (Clemente et al., 1990) deve necessariamente essersi verificato successivamente alla divergenza tra Papionini e Cercopithecini (Tab. 2), in un ancestrale che l'ha poi trasmesso a tutte le specie discendenti (Dutrillaux, 1979; Stanyon et al., 2008) (Fig. 31 e 32). Invece, il polimorfismo connesso alla sintenia, nella forma eterozigotica, è stato riscontrato solo su due delle specie analizzate (*petaurista* e *mitis*) (Fig. 31 e 32, a destra).

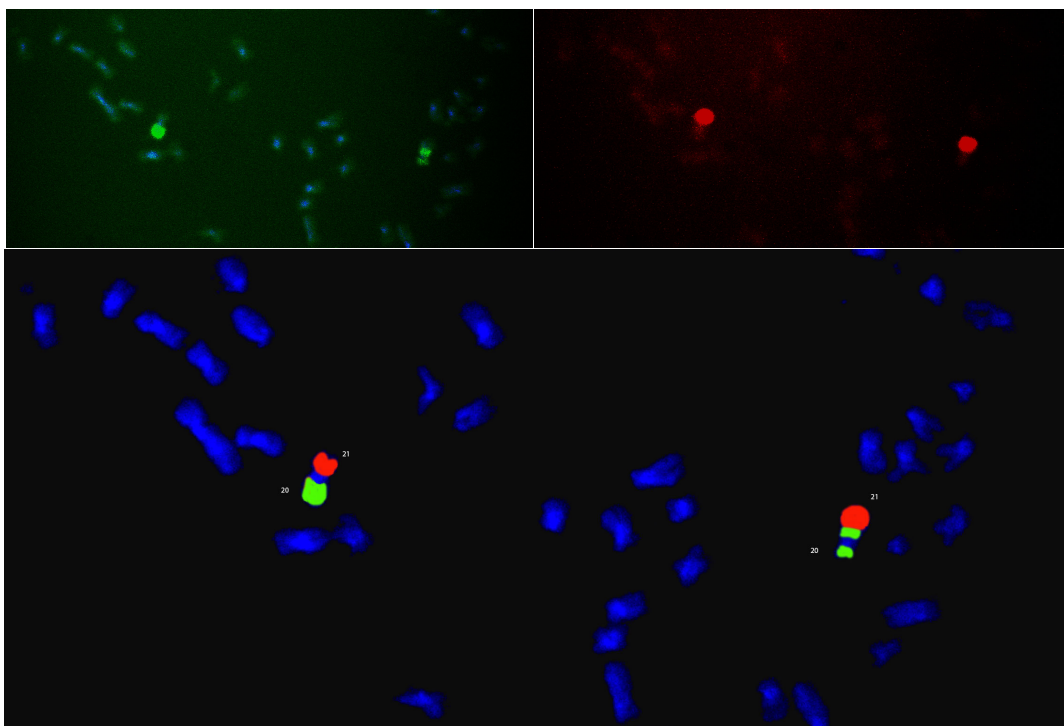


Figura 31. In alto a sinistra, segnale di ibridazione di HSA20 su cromosomi omologhi di CPE; in alto a destra, HSA21 sull'altro braccio dei cromosomi; in basso, ricostruzione del doppio segnale di ibridazione su metafase di CPE.

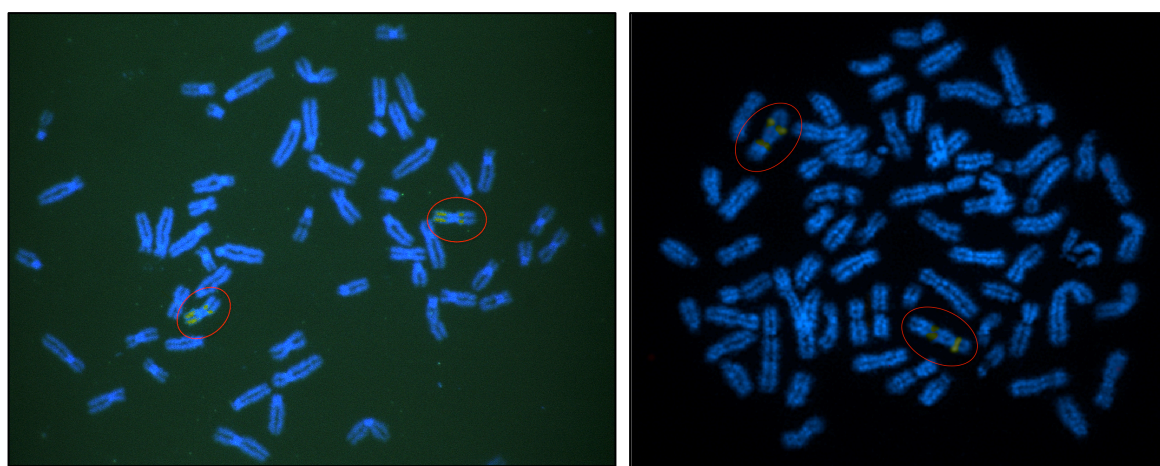


Figura 32. A sinistra, ibridazione di HSA20 su cromosomi omologhi di CAE. A destra, segnale HSA20 su cromosomi di CMI. I cerchi evidenziano i segnali di ibridazione.

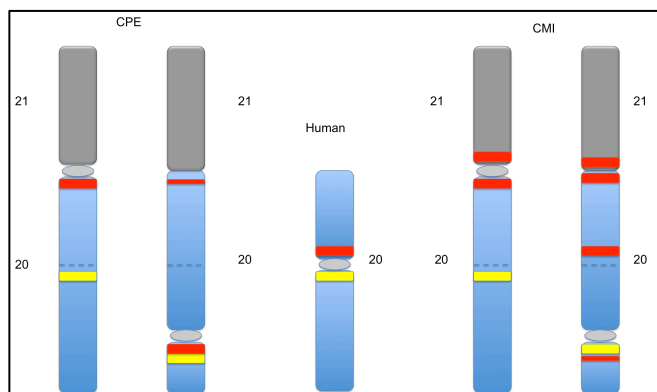


Figura 33. Ideogrammi di HSA20 e dei cromosomi 20 e 21 omologhi di CPE e CMI. Immagine per gentile concessione del Prof. Stanyon.

Non è emersa nessuna differenza tra cromosomi omologhi dall'analisi dei cariotipi di *patas* ed *aethiops* e, ovviamente, degli outgroup. Questo dato potrebbe avallare l'ipotesi di una maggiore vicinanza tra *E. patas* e *C. aethiops* rispetto agli altri componenti della tribù. Tuttavia, l'assenza in queste due specie potrebbe anche essere dovuta al manifestarsi della sola forma omozigotica negli individui campionati, il che non esclude l'eventualità che in altri organismi delle due specie possa essere presente anche la forma eterozigotica. Infatti, per il gruppo *aethiops*, il polimorfismo è stato riportato (Finelli et al., 1999; Moulin et al., 2008).

In forma omozigotica, entrambi i cromosomi umani (HSA) rendono fluorescenti le stesse porzioni dei cromosomi omologhi di primate (Fig. 32, a sinistra). Nel caso del polimorfismo eterozigotico, al contrario, gli HSA ibridano porzioni diverse (Ponsà et al., 1986; Sineo, 1990) (Fig. 31 e 32 a destra). Tali porzioni variano in base al cromosoma omologo che si sta osservando: in uno dei due, il centromero è maggiormente spostato verso il telomero, poiché si è verificata un'inversione pericentrica e/o uno spostamento del centromero (Kirkpatrick & Barton, 2006) (Fig. 31). La differenza tra i cromosomi omologhi di *petaurista*, mostrati in Figura 27, sembra dovuta alla migrazione del centromero in un'altra posizione, anche se l'ipotesi dell'attivazione di un nuovo centromero e della sua coesistenza con il vecchio non è da scartare (Stanyon et al., 2008; Rocchi et al., 2012). La Figura 31 (in basso) ricostruisce la sintenia 20/21 ed è stata realizzata partendo dai singoli segnali di ibridazione ottenuti con le sonde HSA20 (verde) e HSA21 (rosso) sulla stessa metafase di *petaurista* (Fig. 31, in alto). Nel caso presentato, il polimorfismo appare nella sua variante eterozigotica: la sonda HSA20 (in verde) nel cromosoma omologo di sinistra ibrida un intero braccio (q), mentre in quello di destra si lega al braccio corto e a parte di quello lungo, nella porzione immediatamente adiacente al centromero (p + parte di q); la sonda HSA21 (rosso), invece, ibrida a sinistra il braccio corto (p) e a destra solo parte del braccio lungo (parte di q) (Fig. 31). Ciò è stato verificato anche nella specie *C. mitis*, in cui i due cromosomi omologhi non appaiono identici (Fig. 27, a sinistra), ma ibridano porzioni diverse dei cromosomi di primate (Fig. 32, a destra). In questo caso non sono state utilizzate sonde intere, ma *locus*-specifiche nel laboratorio del Prof. Stanyon.

Lo scenario descritto per le specie *petaurista* e *mitis* è riassunto nello schema della Figura 33, in cui sono illustrati sia la sintenia dei cromosomi 20/21 che lo spostamento del centromero. Come si può notare, la fusione dei cromosomi umani 20 e 21 ha portato alla perdita del materiale genetico contenuto nei bracci corti (p) dei due cromosomi. In tal senso, si può parlare di traslocazione robertsoniana e riduzione del numero cromosomico. Inoltre, dallo schema si

evinces che il polimorfismo coinvolge unicamente il cromosoma 20, perché i due bracci corti (HSA21) si mostrano omozigotici.

Nelle specie *E. patas* e *C. aethiops* il segnale HSA20 si distribuisce soltanto su una porzione dei cromosomi omologhi (p + parte di q), ad indicare che la sintenia è stata mantenuta anche in queste specie (Fig. 32, a sinistra). Il polimorfismo, al contrario, non è stato evidenziato. In letteratura è stato riportato per il gruppo *aethiops* (Finelli et al., 1999; Moulin et al., 2008) ma non per *patas* (Moulin et al., 2008).

Poiché sia la sintenia che il polimorfismo sono stati evidenziati in forme differenti (Moulin et al., 2008) e in individui appartenenti a specie differenti (Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008) sembra non siano correlati ad eventi di speciazione. Inoltre, finora, in letteratura non è emersa alcuna prova di una variazione fenotipica di cui siano responsabili le due forme di polimorfismo. Probabilmente, si tratta di una mutazione neutra, mantenutasi nonostante l'assenza di un evidente vantaggio (Klein et al., 1998), proprio a causa della sua neutralità. Inoltre, i cromosomi coinvolti presentano dimensioni ridotte e sono costituiti principalmente da aree di sequenze ripetute, in special modo il cromosoma 21 (Richard & Dutrillaux, 1998; Misceo et al., 2005). Modifiche alle loro sequenze, pertanto, non sono necessariamente inconciliabili con la sopravvivenza degli individui, come dimostra l'unica trisomia autosomica – la trisomia 21 - che nell'uomo non porta alla morte poco dopo la nascita (Griffiths et al., 1999). L'assenza di conseguenze evidenti e di eventi mutazionali connessi, dunque, deve aver contribuito al permanere della sintenia e del polimorfismo fino ad oggi. La mancanza di manifestazioni fenotipiche per le differenze cromosomiche individuate dimostra che la grande variabilità cromosomica che caratterizza le specie della tribù Cercopithecini non è necessariamente connessa a fenomeni speciativi. Sulla base delle informazioni citogenetiche ottenute in laboratorio e in letteratura, non è emerso un trend di variabilità comune né a livello di numero cromosomico né di mutazioni.

4. CONCLUSIONI

Le informazioni ricavate dalla morfometria geometrica e dalla citogenetica permettono di legittimare il collocamento delle numerose specie di Cercopithecini all'interno di un unico raggruppamento tassonomico. Infatti, il piano anatomico del cranio si mostra relativamente uniforme e generalizzato nelle specie analizzate, mentre la sintenia dei cromosomi umani 20 e 21 è presente in tutti i componenti della tribù. Tuttavia, l'approfondita indagine condotta ha evidenziato l'esistenza di differenze morfometriche nella forma dei crani e la presenza di polimorfismi variabili associati alla sintenia cromosomica.

L'impiego della morfometria geometrica ha permesso di riconoscere quattro generi all'interno della tribù Cercopithecini: *Allenopithecus*, *Miopithecus*, *Erythrocebus* e *Cercopithecus*. Il primo genere, costituito dall'unica specie *A. nigroviridis*, presenta molti caratteri in comune con i Papionini (Hill, 1966; Eckhardt, 1979; Fleagle, 1998; Chatterjee et al., 2009), ragion per cui il suo collocamento filogenetico è stato oggetto di numerose revisioni (Napier & Napier, 1967; Dutrillaux et al., 1988; Groves, 1991; Disotell & Raaum, 2002; Tosi et al., 2005; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013). Dal punto di vista morfometrico, la forma cranica dell'unica specie di *Allenopithecus* esistente combacia con quella delle specie appartenenti al genere *Cercopithecus*. Tuttavia, le analisi sulla forma media la collocano ben separata sia dagli altri cercopiteci che dagli outgroup. Ciò porta a concludere che il cercopiteco di Allen rappresenti una specie con un proprio peculiare cammino che l'ha portata a mantenere alcuni caratteri papiomorfi e a modificarne altri in parallelo con i cercopiteci. La sua evoluzione precoce, tuttavia, non implica che debba necessariamente essere considerato l'ancestrale del gruppo, poiché nel complesso, le sue particolari caratteristiche sembrano indicarlo piuttosto come un solitario ramo dell'evoluzione (Springer et al., 2012). Studi citogenetici hanno confermato l'esistenza della sintenia HSA20/21 anche in questa specie (Moulin et al., 2008; Stanyon et al., 2008), giustificandone il posizionamento all'interno del clade Cercopithecini in accordo con le più recenti sistematiche (Groves, 2001; Grubb et al., 2003). Anche il genere *Miopithecus* è stato oggetto di frequenti indagini, poiché presenta caratteri in comune con i Papionini e caratteri unici come il nanismo e l'aspetto neotenico del cranio (Hill, 1966; Dutrillaux et al., 1988; Arnold et al., 2010; Lo Bianco et al., *submitted*). La sua morfologia pedomorfica risulta una conseguenza allometrica della riduzione dei tassi di accrescimento (Shea, 1992) e, in effetti, l'analisi della regressione indica che la taglia incide per il 59.86% sulla forma ($p < .0001$). È probabile che i miopiteci siano andati incontro ad un evento speciativo precoce ed indipendente, che li ha portati a divergere dall'ancestrale

comune, pressappoco in concomitanza con l'origine del genere *Allenopithecus* nel Miocene Inferiore. Tuttavia, nonostante la forma differente, i cercopiteci nani rientrano nello spazio morfometrico dei Cercopithecini, diametralmente opposti ai Papionini. Inoltre, presentano la sintenia 20/21 (Moulin et al., 2008; Stanyon et al., 2008), rendendo il collocamento all'interno della tribù un dato accertato. Il ruolo da ancestrale, tuttavia, come nel caso di *Allenopithecus*, non è stato unanimemente confermato, lasciando aperta l'ipotesi di un cammino ancestrale ma solitario (Springer et al., 2012).

Come *Miopithecus*, il genere *Erythrocebus* si presenta sostanzialmente diverso dagli altri cercopiteci s.l., giustificandone la collocazione – supportata dalla morfometria craniale – in un rango tassonomico a se stante. Dal punto di vista scheletrico il suo cranio risulta profondamente differente da quelli degli altri cercopiteci, richiamando le forme del genere *Macaca*. Tuttavia, l'aspetto differente da un lato e comune dall'altro non indica prossimità filogenetica, poiché è dovuto ad un allungamento del neurocranio come conseguenza dell'aumento dimensionale. *Erythrocebus*, inoltre, mostra un'attitudine prevalentemente terricola assente nel resto dei Cercopithecini, ma tale aspetto non emerge dall'analisi morfometrica. Il piano anatomico, la posizione e l'inclinazione del forame, infatti, rimangono uniformi e in linea con quelli dei cercopiteci (Zihlman & Underwood, 2013). Inoltre, *patas* presenta la sintenia 20/21 che nelle macache, invece, è assente, ma non presenta il polimorfismo in forma eterozigotica. In aggiunta, le ricostruzioni paleoecologiche individuano la radiazione dei generi *Erythrocebus* e *Cercopithecus* al confine tra il Miocene e il Pliocene (Pickford & Senut, 1988; Tosi et al., 2005; Perelman et al., 2011; Guschanski et al., 2013; Gilbert et al., 2014), successivamente alla divergenza tra Papionini e Cercopithecini (Tab. 2). In seguito, un'evoluzione guidata da pressioni ecologiche in ambienti di savana e boscaglia potrebbe aver condizionato l'aspetto odierno degli eritrocebi, chiarendo l'elevato grado di convergenza tra *patas* e *aethiops*. Nel caso dei gruppi *aethiops* e *lhoesti*, le prove morfometriche non supportano l'esistenza di due generi distinti, mantenendoli all'interno del genere *Cercopithecus* (Grubb et al., 2003). Dal punto di vista cranico, i due gruppi si distinguono dal genere *Cercopithecus* unicamente per un maggiore prognatismo e una minore robustezza della struttura mandibolare. Tuttavia, tali differenze sono da implicare ad un lieve incremento dimensionale e ad adattamenti ambientali, non a distanza evolutiva. Infatti, l'adattamento agli ambienti aperti e di boscaglia delle specie del gruppo *aethiops* non si è tradotto in un'evoluzione scheletrica vera e propria. Allo stesso modo, le specie del gruppo *lhoesti* sono primati tipicamente forestali, con attitudini alla vita semi-terricola (Gebo & Sargis, 1994; McGraw, 2002; Sargis et al., 2008), ma un pattern anatomico basale da

cercopiteco s.s. Pertanto, nonostante *aethiops* e *lhoesti* abitino in ambienti più aperti (non prettamente forestali) e presentino attitudini sia arboricole che terricole molto più volubili (Hill, 1966; Harrison, 1982; Barret, 2005), l'alta percentuale di terrestrialità riportata per i due gruppi (Gebo & Sargis, 1994; McGraw, 2002; Sargis et al., 2008) appare una conseguenza delle abitudini alimentari nei bassi strati della foresta e ai suoi margini piuttosto che una specifica esigenza scheletrica (Kaplin, 2002; Tolo et al., 2008). Inoltre, i due gruppi *aethiops* e *lhoesti* presentano la sintenia 20/21 (Moulin et al., 2008), ma il polimorfismo non è stato accertato, ad indicare un limitato numero di riarrangiamenti sia morfometrici che cromosomici dalla loro comparsa ad oggi.

Nonostante le specie all'interno del genere *Cercopithecus* appaiano sia cariotipicamente che fenotipicamente dissimili, l'uniformità morfometrica evidenzia come gli adattamenti secondari che si sono super-imposti in relazione alle necessità ambientali abbiano differenziato le specie sulla base dei pattern facciali e cromosomici ma non scheletrici. Tale risultato è supportato dallo scenario di una radiazione recente, iniziata nell'Africa sub-sahariana e sviluppata attraverso diversi meccanismi (geografici, fenotipici e cariotipici) nei rifugi forestali plio-pleistocenici (Leakey, 1988; Colyn, 1991; Butynski, 2002; Tosi et al., 2005). L'ipotesi più parsimoniosa, pertanto, risulta quella dell'esistenza di un unico ampio genere – *Cercopithecus* – e di diversi *species groups* (Hill, 1966; Grubb et al., 2003). La variabilità di questi gruppi risiede maggiormente a livello ecologico, facciale e cariotipico, mentre i distretti scheletrici e le sintenie cromosomiche si mostrano condivisibili. Le pressioni ecologiche che hanno agito sulla colorazione piuttosto che sull'anatomia dello scheletro spiegano perché le analisi morfometriche non riescano a discriminare le specie al di sotto del rango di genere. Le relazioni di livello specifico, infatti, rimangono una questione aperta nello studio della tribù. Inoltre, la presenza di polimorfismi diversi confonde le relazioni tra le specie, nonostante l'assenza in alcune specie possa essere sintomo di analogo destino evolutivo.

La suddivisione dei Cercopithecini in specie arboricole e terricole non è confermata dalla morfometria cranica, ad indicare l'azione di fenomeni di adattamento locale super-imposti su strutture scheletriche generaliste. Tale assenza di correlazione tra le attitudini e la morfometria all'interno del genere *Cercopithecus* limita la validità della dicotomia proposta per descrivere la tribù Cercopithecini. Come precedentemente osservato (Martin & MacLarnon, 1988), l'esistenza di due cladi distinti sulla base delle attitudini ecologico-locomotorie non sembra realistica. Inoltre, la presenza del forame magno e delle orbite nella stessa posizione per tutte le specie lascia intendere che il pattern anatomico ancestrale sia stato in larga parte mantenuto. Ciò vale anche nell'ambito delle sintenie cromosomiche, mantenutesi nonostante l'ampio

reshuffling genomico che ha coinvolto le specie dalla loro comparsa ad oggi (Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008). Le forme variabili in cui la sintenia si mostra non sono sufficientemente diagnostiche per poter essere utilizzate in indagini di tipo sistematico, ma forniscono un valido supporto agli studi sulla tribù.

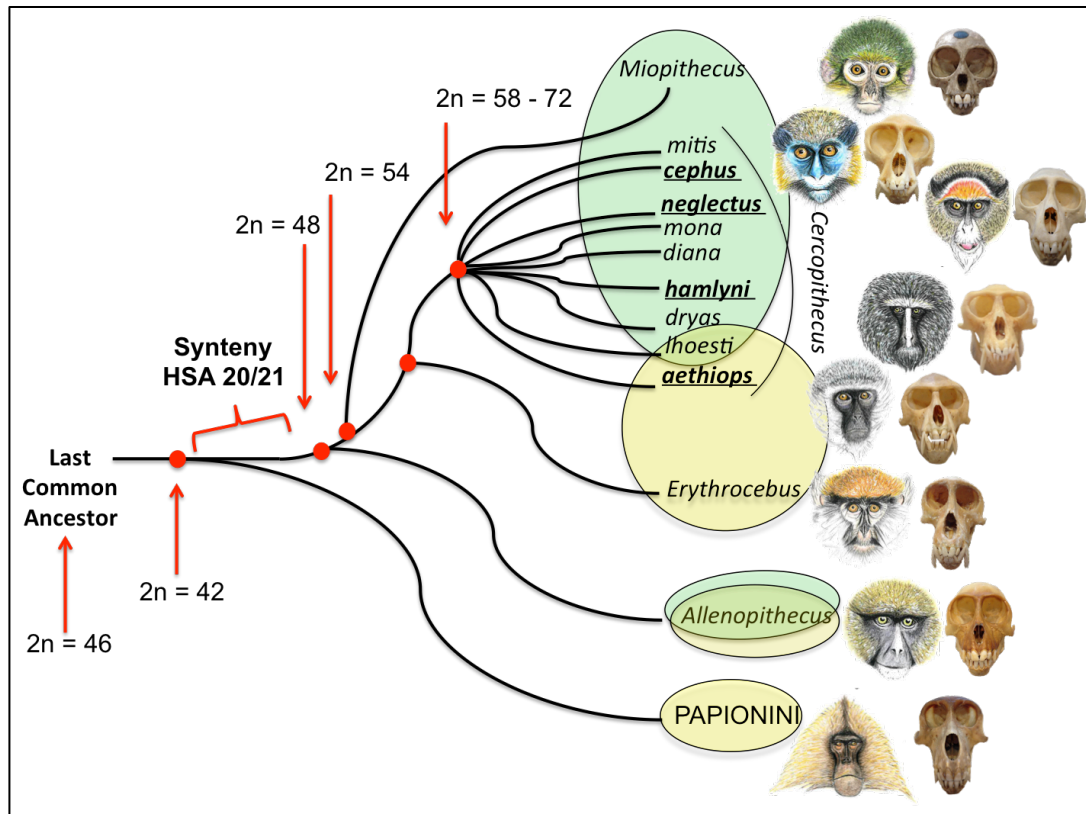


Figura 34. Schema dei generi della tribù Cercopithecini. In evidenza, i numeri diploidi. I riquadri verdi e beige raggruppano rispettivamente le specie con attitudini prevalentemente arboricole e terricole.

La Figura 34 illustra i generi della tribù Cercopithecini, disposti secondo l'ordine di comparsa ricavato dalle più recenti ricostruzioni filogenetiche (Tab. 3). Non mostra relazioni filogenetiche poiché la presenza della sintenia in tutte le specie di cercopiteci e l'esistenza di diverse forme di polimorfismo ad essa associate (Stanyon et al., 2004; Moulin et al., 2008) non permettono di utilizzare tali caratteri per ricostruire la storia evolutiva del taxon. Inoltre, né le differenze morfometriche né le attitudini locomotorie si mostrano sufficientemente discriminanti per chiarire le relazioni tra i diversi generi.

I numeri diploidi riportati su alcuni nodi non evidenziano un chiaro trend. Infatti, la comparsa pressoché contemporanea di specie con numeri cromosomici estremamente variabili all'interno del genere *Cercopithecus* indica che la teoria dell'aumento lineare del numero diploide non trova unanime fondamento (Chiarelli, 1968; Dutrillaux et al., 1988). Non è possibile, dunque, individuare una tendenza cromosomica valida per tutte le specie e tutti i generi, nonostante sia

indubbio che i Cercopithecini siano andati incontro a ripetuti eventi di fissione cromosomica (Stanyon et al., 2008; Stanyon et al., 2011).

Per concludere, è possibile affermare che le specie della tribù dei Cercopithecini appartengono ad un raggruppamento tassonomicamente valido e che le loro differenze risiedono principalmente nelle vivaci colorazioni facciali e nel numero cromosomico, mentre la morfometria cranica e alcune sintenie si mostrano pressoché uniformi. Inoltre, non esistono prove morfometriche a sostegno della dicotomia in specie arboricole e terricole, benché dal punto di vista ecologico sia possibile riconoscere specie con abitudini maggiormente tendenti verso l'una o l'altra attitudine.

La comparsa relativamente recente della maggior parte delle specie, la coesistenza spesso simpatica, i bassi tassi di mutazione scheletrica e la presenza di sinapomorfie si sono tradotti nel mantenimento di una struttura generalizzata su cui le diverse specie hanno evoluto peculiari caratteri fenotipici.

5. COLLABORAZIONI

Parallelamente alle analisi morfometriche e citogenetiche effettuate sulle specie della tribù dei Cercopithecini e su 11 specie di outgroup, sono iniziate due collaborazioni collaterali: la prima con il Dott. Stefano Reale, all'interno del laboratorio di Tecnologie Diagnostiche Innovative dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZSS); la seconda con la Dott.ssa Antonella Lannino del Dipartimento di Fisica e Chimica e la Dott.ssa Barbara Manachini e il Prof. Arizza del Dipartimento STEBICEF.

La prima collaborazione è nata con l'obiettivo di investigare il *DNA Barcode* di alcune specie di primate, al fine di approfondire le conoscenze in possesso della comunità scientifica in un'ottica di conservazione della biodiversità (Hebert & Gregory, 2005; Ratnasingham & Hebert, 2007). Il concetto di *barcode* parte dall'assunzione che le differenze intraspecifiche siano minori di quelle interspecifiche e mira ad individuare un codice identificativo – un'etichetta – per ogni singola specie (Hebert et al., 2003). Con i *primers* universali di Folmer (Folmer et al., 1994), si è proceduto all'amplificazione del segmento della Citocromo Ossidasi sub-unità 1 (CO1) di sette specie di primati (*Cebus capucinus* (CCA), *Varecia variegata* (VVA), *Macaca arctoides* (MAR), *Pygathrix sp* (PSP), *Eulemur fulvus* (EFU), *Cercopithecus (Chl.) aethiops* (CAE) e *Cercopithecus petaurista* (CPE)). Finora, sono state ottenute le sequenze delle specie *V. variegata* e *C. petaurista* (Fig. 35), ma ulteriori analisi sono in programmazione.

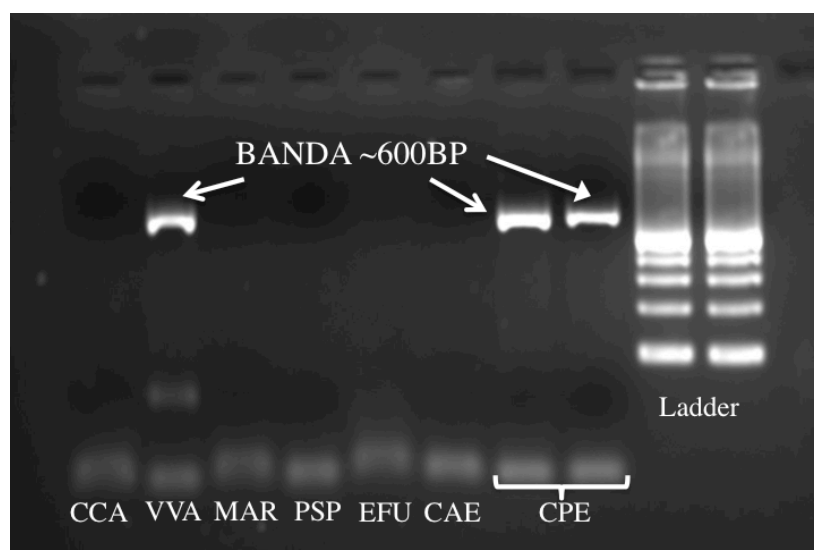


Figura 35. Corsa elettroforetica del DNA di 7 specie di primate.

La seconda collaborazione, in relazione alla recente colonizzazione della Sicilia da parte della specie alloctona *Rhynchophorus ferrugineus* (Longo *et al.*, 2008), ha voluto unire le tecniche citogenetiche con gli aspetti entomologici, al fine di implementare le conoscenze in possesso su questa specie e contrastarne gli effetti nocivi (Fig. 36). Il lavoro che ne è stato tratto (*Chromosome studies in North-Western Sicily males of Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Curculionidae: Dryophthorinae)) (Sez. Allegati, Pubblicazioni) è stato inviato alla rivista “Bulletin of Insectology”.

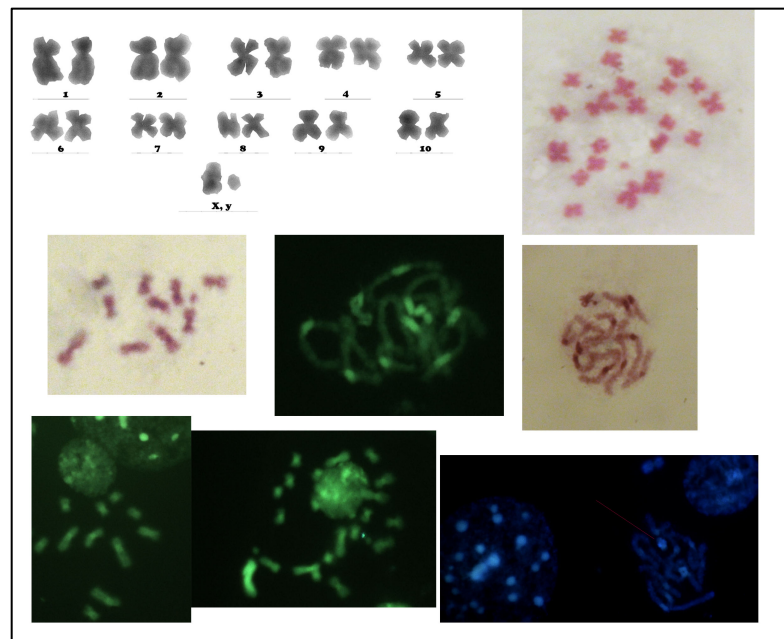


Figura 36. Immagini al microscopio del materiale cromosomico e spermatico del punteruolo rosso (*Rhynchophorus ferrugineus*).

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, J. M., & Faure, H. (1997). Global land environments since the last interglacial. *Oak Ridge National Laboratory, TN, USA*, 20.
- Aiello, L., & Dean, C. (1990). *An introduction to human evolutionary anatomy*. Academic Press.
- Allen, W. L., Stevens, M., & Higham, J. P. (2014). Character displacement of Cercopithecini primate visual signals. *Nature communications*, 5.
- Amaral P. J. S., Finotelo L. F. M., De Oliveira E. H. C., Pissinatti A., Nagamachi C. Y. & Pieczarka J. C., 2008. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 169.
- Arnold C, Matthews LJ, Nunn CL. 2010. The 10kTrees website: a new online resource for primate phylogeny. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 19(3), 114-118.
- Babu, K. A., & Verma, R. S. (1985). Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int Rev Cytol*, 94, 151-176.
- Bagnara, J. T., Fernandez, P. J., & Fujii, R. (2007). On the blue coloration of vertebrates. *Pigment Cell Research*, 20(1), 14-26.
- Barrett AS. 2005. Foraging ecology of the vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) in mixed lowveld bushveld and sour lowveld bushveld of the Blydeberg Conservancy, Northern Province, South Africa. D. Phil. Thesis, Liverpool University.
- Benefit, B. R. (1999). Biogeography, dietary specialization, and the diversification of African Plio-Pleistocene monkeys. *African Biogeography, Climate Change, and Human Evolution*, 172-188.
- Bobe, R., Behrensmeyer, A. K., & Chapman, R. E. (2002). Faunal change, environmental variability and late Pliocene hominin evolution. *Journal of Human Evolution*, 42(4), 475-497.
- Bonnefille, R. (2010). Cenozoic vegetation, climate changes and hominid evolution in tropical Africa. *Global and Planetary Change*, 72(4), 390-411.
- Brinkley, B. R., Stubblefield, E., & Hsu, T. C. (1967). The effects of colcemid inhibition and reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of Chinese hamster cells in vitro. *Journal of ultrastructure research*, 19(1), 1-18.
- Bruner, E., & Gippoliti, S. (2006). *Le collezioni primatologiche italiane*. Istituto Italiano di Antropologia.

- Butynski, T. M. (2002). The guenons: An overview of diversity and taxonomy. In *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 3-13). Springer US.
- Butynski, T. M. Kingdon, J. & Kalina, J. (eds) 2013. *Mammals of Africa. Volume II: Primates*. Bloomsbury Publishing, London.
- Buzzard, P. J. (2006). Cheek pouch use in relation to interspecific competition and predator risk for three guenon monkeys (*Cercopithecus* spp.). *Primates*, 47(4), 336-341.
- Cardini, A., Jansson, A. U., & Elton, S. (2007). A geometric morphometric approach to the study of ecogeographical and clinal variation in vervet monkeys. *Journal of Biogeography*, 34(10), 1663-1678.
- Cardini, A., & Elton, S. (2008a). Variation in guenon skulls (I): species divergence, ecological and genetic differences. *Journal of Human Evolution*, 54(5), 615-637.
- Cardini, A., & Elton, S. (2008b). Variation in guenon skulls (II): sexual dimorphism. *Journal of human evolution*, 54(5), 638-647.
- Cardini, A., & Elton, S. (2009). Geographical and taxonomic influences on cranial variation in red colobus monkeys (Primates, Colobinae): introducing a new approach to 'morph' monkeys. *Global Ecology and Biogeography*, 18(2), 248-263.
- Cardini, A. (2013). Geometric Morphometrics, in Biological Science Fundamental and Systematics, Eds. UNESCO-EOLSS Joint Committee, in Encyclopedia Of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK: <http://www.eolss.net>
- Chapman, C. A., Chapman, L. J., Cords, M., Gathua, J. M., Gautier-Hion, A., Lambert, J. E., ... & White, L. J. (2002). Variation in the diets of *Cercopithecus* species: differences within forests, among forests, and across species. In *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 325-350). Springer US.
- Chatterjee, H. J., Ho, S. Y., Barnes, I., & Groves, C. (2009). Estimating the phylogeny and divergence times of primates using a supermatrix approach. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 259.
- Chiarelli, B. (1968). Chromosome polymorphism in the species of the genus *Cercopithecus*. *Cytologia*, 33(1), 1-16.
- Christiansen, P. (2008). Evolution of skull and mandible shape in cats (Carnivora: Felidae). *PLoS One*, 3(7), e2807.
- Clemente I. C., Ponsa M., García M., & Egozcue J., 1990. Evolution of the Simiiformes and the phylogeny of human chromosomes. *Human genetics*, 84(6), 493-506.

- Colyn, M. (1991). L'importance zoogeographique du bassin du fleuve Zaire pour la speciation: le cas des primates simiens. *Tervuren, Belgie: Koninklijk Museum voor Midden-Afrika*.
- Colyn, M., & Deleporte, P. (2002). Biogeographic analysis of central African forest guenons. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 61-78). Springer US.
- de Jong, Y. A. D., & Butynski, T. M. (2010). Three sykes's monkey *Cercopithecus mitis* × vervet monkey *Chlorocebus pygerythrus* hybrids in Kenya. *Primate Conservation*, (25), 43-56.
- De Pontbriand, A., Wang, X. P., Cavaloc, Y., Mattei, M. G., & Galibert, F. (2002). Synteny comparison between apes and human using fine-mapping of the genome. *Genomics*, 80(4), 395-401.
- Deloukas, P., Matthews, L. H., Ashurst, J., Burton, J., Gilbert, J. G. R., Jones, M., ... & Bailey, J. (2001). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature*, 414(6866), 865-871.
- deMenocal, P. B. (2004). African climate change and faunal evolution during the Pliocene–Pleistocene. *Earth and Planetary Science Letters*, 220(1-2), 3-24.
- Detwiler, K. M. (2002). Hybridization between red-tailed monkeys (*Cercopithecus ascanius*) and blue monkeys (*C. mitis*) in East African forests. In *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 79-97). Springer US.
- Disotell, T. R., & Raaum, R. L. (2002). Molecular timescale and gene tree incongruence in the guenons. In *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 27-36). Springer US.
- Dunham, I., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., ... & Bagguley, C. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, 402(6761), 489-495.
- Dutrillaux, B., Viegas-Pequignot, E., Couturier, J., & Chauvier, G. (1978). Identity of euchromatic bands from man to Cercopithecidae. *Human genetics*, 45(3), 283-296.
- Dutrillaux, B. (1979). Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Human genetics*, 48(3), 251-314.
- Dutrillaux, B., Muleris, M., & Couturier, J. (1988). Chromosomal evolution of Cercopithecinae. *A Primate Radiation: Evolutionary Biology of the African Guenons*, 150-159.

- Eckhardt, R. B. (1979). Chromosome evolution in the genus *Cercopithecus*. *Comparative Karyology of Primates*, Mouton Publishers, New York, 39-46.
- Elliot, D. G. (1913). *A Review of the Primates: Anthropeidea, Miopithecus to Pan (Vol. 3)*. American Museum of Natural History.
- Eriksson, J., Hohmann, G., Boesch, C., & Vigilant, L. (2004). Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 13(11), 3425-3435.
- Finelli, P., Stanyon, R., Plesker, R., Ferguson-Smith, M. A., O'Brien, P., & Wienberg, J. (1999). Reciprocal chromosome painting shows that the great difference in diploid number between human and African green monkey is mostly due to non-Robertsonian fissions. *Mammalian genome*, 10(7), 713-718.
- Fleagle, J. G. (1985). Size and adaptation in primates. In *Size and scaling in primate biology* (pp. 1-19). Springer US.
- Fleagle, J. G. (1998). *Primate Adaptation and Evolution: 2nd Edn*. Academic Press.
- Fleagle, J. G., Gilbert, C. C., & Baden, A. L. (2010). Primate cranial diversity. *American journal of physical anthropology*, 142(4), 565-578.
- Fogle T. & Wood M., 1981. Chromosome Banding of *Cercopithecus neglectus*. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*. Vol. 91.
- Folmer O., Black M-, Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R., 1994. Dna primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- Gautier, J. P. (1988). Interspecific affinities among guenons as deduced from vocalizations. *A primate radiation: Evolutionary biology of the African guenons*, 194-226.
- Gautier, J. P., Drubbel, R. V., & Deleporte, P. (2002). Phylogeny of the *Cercopithecus lhoesti* group revisited: Combining multiple character sets. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 37-48). Springer US.
- Gautier-Hion, A., Quris, R., & Gautier, J. P. (1983). Monospecific vs polyspecific life: a comparative study of foraging and antipredatory tactics in a community of *Cercopithecus* monkeys. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 12(4), 325-335.
- Gautier-Hion, A. (1988). Polyspecific associations among forest guenons: ecological, behavioural and evolutionary aspects. *A Primate Radiation: evolutionary biology of the African guenons*, 452-476.
- Gautier-Hion A, Bourliere F, Gautier JP, Kingdon J (1988) *A Primate Radiation: Evolutionary Biology of the African Guenons*. New York: Cambridge University Press.

- Gebo, D. L., & Sargis, E. J. (1994). Terrestrial adaptations in the postcranial skeletons of guenons. *American Journal of Physical Anthropology*, 93(3), 341-371.
- Gilbert, C. C. (2011). Phylogenetic analysis of the African papionin basicranium using 3-D geometric morphometrics: The need for improved methods to account for allometric effects. *American journal of physical anthropology*, 144(1), 60-71.
- Gilbert, C. C. (2012). Early old world monkeys from Africa and Arabia: implications for the origins and biogeography of major cercopithecoid clades.
- Gilbert, C. C., Bibi, F., Hill, A., & Beech, M. J. (2014). Early guenon from the late Miocene Baynunah Formation, Abu Dhabi, with implications for cercopithecoid biogeography and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10119-10124.
- Gippoliti, S. (2007, December). Da Antinori a Zavattari: uno sguardo alle collezioni primatologiche italiane e al loro ruolo per la conservazione della biodiversità. In *Atti del XVII Congresso ANMS—Al di là delle Alpi e del Mediterraneo—Verona* (Vol. 4, p. 7).
- Glenn, M. E., & Cords, M. (2004). The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys. *Developments in Primatology: Progress and Prospects*.
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Miller, J. H., & Lewontin R. C. (1999). Modern Genetic Analysis. New York: W. H. Freeman. Changes in Chromosome Number.
- Groves, C. P. (1989). A theory of human and primate evolution. Oxford, England: Clarendon Press.
- Groves, C. P. (2001). Primate taxonomy. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Grubb, P., Sandrock, O., Kullmer, O., Kaiser, T. M., & Schrenk, F. (1999). Relationships between eastern and southern African mammal faunas. *African biogeography, climate change, and human evolution (GT Bromage and F. Schrenk, eds.)*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 253-267.
- Grubb, P., Butynski, T. M., Oates, J. F., Bearder, S. K., Disotell, T. R., Groves, C. P., & Struhsaker, T. T. (2003). Assessment of the diversity of African primates. *International Journal of Primatology*, 24(6), 1301-1357.
- Grubb, P. (2006). Geospecies and superspecies in the African primate fauna. *Primate Conservation*, 75-78.
- Guillén, A. K. Z., Hirai, Y., Tanoue, T., & Hirai, H. (2004). Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosome Research*, 12(3), 225-237.

- Guschanski, K., Krause, J., Sawyer, S., Valente, L. M., Bailey, S., Finstermeier, K., ... & Savolainen, V. (2013). Next-generation museomics disentangles one of the largest primate radiations. *Systematic biology*, 62(4), 539-554.
- Hamilton, A. C. (1988). Guenon evolution and forest history. *A primate radiation: evolutionary biology of the African guenons*, 13-34.
- Harris, T. R., & Chapman, C. A. (2007). Variation in diet and ranging of black and white colobus monkeys in Kibale National Park, Uganda. *Primates*, 48(3), 208-221.
- Harrison MJS. 1982. The behavioural ecology of Greem Monkey (*C. aethiops sabaesus*) at Mt. Assirik, Senegal. University of Stirling. PhD Dissertation, 1982.
- Hart, J. A., Detwiler, K. M., Gilbert, C. C., Burrell, A. S., Fuller, J. L., Emetshu, M., ... & Tosi, A. J. (2012). Lesula: a new species of *Cercopithecus* monkey endemic to the Democratic Republic of Congo and implications for conservation of Congo's Central Basin. *PLoS One*, 7(9), e44271.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., ... & Soeda, E. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405(6784), 311-319.
- Haus, T., Akom, E., Agwanda, B., Hofreiter, M., Roos, C., & Zinner, D. (2013). Mitochondrial diversity and distribution of African green monkeys (*Chlorocebus* Gray, 1870). *American journal of primatology*, 75(4), 350-360.
- Heads, M. (2011). *Molecular panbiogeography of the tropics* (Vol. 4). Univ of California Press.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. & De Waard J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 313–321.
- Hebert P. D. & Gregory T. R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Heng, H. H., & Tsui, L. C. (1993). Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. *Chromosoma*, 102(5), 325-332.
- Hennig W. (1999). *Genetica* (Eds). Zanichelli.
- Hill, D. W. C. O. (1966). *Primates, Comparative Anatomy and Taxonomy,...: A Monograph by WC Osman Hill,... Catarrhini, Cercopithecoidea, Cercopithecinae, a Monograph...* University Press.
- Hirai H. & Hirai Y., 2004. Chimpanzee chromosomes: rDNA silencing due to position effects of heterochromatin. In: Sineo L, Stanyon R (eds): *Primate Cytogenetic and Comparative Genomics*, pp 19–32. Firenze University Press, Firenze.

- Holly Smith B., Crummett T. L. & Brandt K. L. (1994). Ages of eruption of primate teeth: a compendium for aging individuals and comparing life histories. *American Journal of Physical Anthropology*, 37(S19), 177-231.
- Ijdo, J. W., Baldini, A., Ward, D. C., Reeders, S. T., & Wells, R. A. (1991). Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(20), 9051-9055.
- Isbell, L. A. (1998). Diet for a small primate: Insectivory and gummivory in the (large) patas monkey (*Erythrocebus patas pyrrhonotus*). *American Journal of Primatology*, 45(4), 381-398.
- Kamilar, J. M., Martin, S. K., & Tosi, A. J. (2009). Combining biogeographic and phylogenetic data to examine primate speciation: an example using cercopithecine monkeys. *Biotropica*, 41(4), 514-519.
- Kaplin, B. A. (2002). Terrestriality and the maintenance of the disjunct geographical distribution in the lhoesti group. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 49-59). Springer US.
- Kawamoto, Y., Takemoto, H., Higuchi, S., Sakamaki, T., Hart, J. A., Hart, T. B., ... & Furuichi, T. (2013). Genetic structure of wild bonobo populations: diversity of mitochondrial DNA and geographical distribution. *PloS one*, 8(3), e59660.
- Kingdon, J. (1988a). Comparative morphology of hands and feet in the genus *Cercopithecus*. *A primate radiation: evolutionary biology of the African guenons*, 184-193.
- Kingdon, J. (1988b). What are face patterns and do they contribute to reproductive isolation in guenons. *A Primate Radiation: Evolutionary Biology of the African Guenons*, 227-245.
- Kirkpatrick M., & Barton N, 2006. Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*, 173(1), 419-434.
- Klein, J., Sato, A., Nagl, S., & O'hUigín, C. (1998). Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1-C1.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353-357.
- Klingenberg C. P. (2013). Cranial integration and modularity: insights into evolution and development from morphometric data. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 43-58.
- Lambert, J. E. (2002). Resource switching and species coexistence in guenons: A community analysis of dietary flexibility. In *The Guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 309-323). Springer US.

- Lambert, J. E. (2005). Competition, predation, and the evolutionary significance of the cercopithecine cheek pouch: the case of *Cercopithecus* and *Lophocebus*. *American journal of physical anthropology*, 126(2), 183-192.
- Leakey, M. (1988). Fossil evidence for the evolution of the guenons. *A primate radiation: Evolutionary biology of the African guenons*, 7-12.
- Lehn, C. (2004). Book Review: The Guenons Diversity and Adaptation in African Monkeys. Edited by Mary E. Glenn and Marina Cords, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, xvi+ 438 pp., 2002, US \$139.50 (hardback). *International Journal of Primatology*, 25(3), 733-735.
- Longo S., Colazza S., Cacciola S. O., Magnano Di San Lio G., 2008 - Il caso delle palme. *Supplemento a "I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili"*, Anno 2007 serie VIII, 4: 65–102.
- Lowry, D. B., & Willis J. H. (2010) A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. *PloS Biol* 8: e1000500. doi:10.1371/journal.pbio.1000500.
- Luboga, S. A. and Wood, B. A. (1990). Position and orientation of the foramen magnum in higher primates. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 81: 67–76. doi: 10.1002/ajpa.1330810108
- Maley, J. (1996). The African rain forest—main characteristics of changes in vegetation and climate from the Upper Cretaceous to the Quaternary. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, 104, 31-73.
- Marcus, L. F., Frost, S. R., & Delson, E. (1997). Comparison of Polhemus 3Draw Pro and Microscribe 3DX. *Internet-publication,* " posted to: *Biological Morphometrics Mailing List Archived at <http://research.amnh.org/nycep/manuscripts.html>*.
- Martin RD, & MacLarnon AM. 1988. Quantitative comparisons of the skull and teeth in guenons. *A primate radiation: evolutionary biology of the African guenons*, 160-183.
- Matthey, R. (1949). The chromosomes of vertebrates. *The chromosomes of vertebrates*.
- McGoogan, K., Kivell, T., Hutchison, M., Young, H., Blanchard, S., Keeth, M., & Lehman, S. M. (2007). Phylogenetic diversity and the conservation biogeography of African primates. *Journal of biogeography*, 34(11), 1962-1974.
- McGraw, W. S. (2002). Diversity of guenon positional behavior. In *The guenons: Diversity and adaptation in African monkeys* (pp. 113-131). Springer US.
- Mikelsaar, A. V., Schmid, M., Krone, W., Schwarzacher, H. G., & Schnedl, W. (1977). Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Human genetics*, 37(1), 73-77.

- Misceo D., Cardone M. F., Carbone L., D'Addabbo P., de Jong P. J., Rocchi M. & Archidiacono N., 2005. Evolutionary history of chromosome 20. *Molecular biology and evolution*, 22(2), 360-366.
- Mitelman F., 1995. *ISCN 1995. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. (Ed.) Karger Publishers.
- Moulin, S., Gerbault-Seureau, M., Dutrillaux, B., & Richard, F. A. (2008). Phylogenomics of African guenons. *Chromosome Research*, 16(5), 783-799.
- Napier JR, & Napier PH. 1967. *A handbook of living primates: morphology, ecology and behaviour of nonhuman primates* (p. 456). London: Academic Press.
- Nederlof, P. M., Van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S., & Van der Ploeg, M. (1990). Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 11(1), 126-131.
- Nichol, J. E. (1999). Geomorphological evidence and Pleistocene refugia in Africa. *Geographical Journal*, 79-89.
- Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research*, 20(4), 462-466.
- O'Brien, S. J., Menninger, J. C., & Nash, W. G. (Eds.). (2006). *Atlas of mammalian chromosomes*. John Wiley & Sons.
- O'Higgins, P., & Jones, N. (2006). Morphologika 2.2. Tools for shape analysis. *Hull York Medical*.
- Oates, J. F. (1988). The distribution of Cercopithecus monkeys in West African forests. *A primate radiation: Evolutionary biology of the African guenons*, 79-103.
- Pan, R., Wei, F., & Li, M. (2003). Craniofacial variation of the Chinese macaques explored with Morphologika. *Journal of morphology*, 256(3), 342-348.
- Passarge, E., Horsthemke, B., & Farber, R. A. (1999). Incorrect use of the term synteny. *Nat Genet*, 23(4), 387.
- Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuánez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A., ... & Pecon-Slattery, J. (2011). A molecular phylogeny of living primates. *PLoS genetics*, 7(3), e1001342.
- Pickford, M. (1986). Major events in primate palaeontology: possible support for climatic forcing models of evolution. *Antropologia Contemporanea*, 9, 89-94.
- Pickford, M., & Senut, B. (1988). Habitat and locomotion in Miocene cercopithecoids. *A Primate Radiation: Evolutionary Biology of the African Guenons*, 35-53.

- Plavcan, J. M., Ward, C. V., & Manthi, F. K. (2013, January). Diminutive cercopithecine teeth from Kanapoi, Kenya, and implications for the evolution of body size and diversity in guenons. In *American Journal Of Physical Anthropology* (Vol. 150, Pp. 222-222). 111 River St, Hoboken 07030-5774, Nj Usa: Wiley-Blackwell.
- Pocock, R. I. (1926). The external characters of the Catarrhine monkeys and apes (Papio, TheroDithecus). In *Proc. Zool. Soc. Lond* (Vol. 2, No. 1479-1579, p. 1926).
- Ponsà, M., & Egozcue, J. (1981). Cytogenetic studies in the species *Cercopithecus pogonias* (Bennet 1833) and *Cercopithecus nictitans* (Linnaeus 1966). *International Journal of Primatology*, 2(3), 263-271.
- Ponsà, M., Miro, R., Estop, A. M., & Egozcue, J. (1981). Banding patterns of the chromosomes of *Erythrocebus patas* (Schreber 1774) compared to other primate species. *Genetica*, 56(1), 39-45.
- Ponsà, M., Estop, A., Egozcue, J., Garcia, M., & Miró, R. (1986). Comparative chromosome banding studies in the family Cercopithecidae. *Human Evolution*, 1(6), 525-533.
- Price, J. S., Burton, J. L., Shuster, S., & Wolff, K. (1975). Control of scrotal colour in the vervet monkey. *Journal of medical primatology*, 5(5), 296-304.
- Raaum, R. L., Sterner, K. N., Noviello, C. M., Stewart, C. B., & Disotell, T. R. (2005). Catarrhine primate divergence dates estimated from complete mitochondrial genomes: concordance with fossil and nuclear DNA evidence. *Journal of Human Evolution*, 48(3), 237-257.
- Ratnasingham S. & Hebert P. D., 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Ravi, S., Gilbert, C. C., & Patel, B. A. (2013, January). Reassessing guenon craniodental morphology: Closer inspection reveals support for the arboreal and terrestrial clades. In *American Journal Of Physical Anthropology* (Vol. 150, Pp. 229-230). 111 River St, Hoboken 07030-5774, Nj Usa: Wiley-Blackwell.
- Richard F. & Dutrillaux B., 1998. Origin of human chromosome 21 and its consequences: a 50-million-year-old story. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 6(4), 263-268.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 245(2), 154-160.
- Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi o, and Stanyon R (2012). Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 108, 59–67; doi:10.1038/hdy.2011.101.

- Romagno D, Chiarelli B, Guarducci S, Uzielli MLG, Sineo L (2000). Chromosome mapping of GABRB3 and PML loci in *Macaca* and *Cercopithecus* indicates the mechanism of evolution of human chromosome 15. *Chromosome Research*. 8: 737-749
- Romagno, D. (2001). Primate tables chromosome. *Caryologia*, 54(4), 285-297.
- Rowe, N., Goodall, J., & Mittermeier, R. (1996). *The pictorial guide to the living primates* (p. 263). New York: Pogonias Press.
- Russo, G. A., & Kirk, E. C. (2013). Foramen magnum position in bipedal mammals. *Journal of human evolution*, 65(5), 656-670.
- Ruvolo, M. (1988). Genetic evolution in the African guenons. *A primate radiation: evolutionary biology of the African guenons*, 127-139.
- Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412.
- Saccone S., 1998. Ibridazione In Situ Fluorescente. "Biologia Molecolare in Medicina e Diagnostica". Ordine Nazionale dei Biologi.
- Sargis, E. J., Terranova, C. J., & Gebo, D. L. (2008). Evolutionary morphology of the guenon postcranium and its taxonomic implications. In *Mammalian Evolutionary Morphology* (pp. 361-372). Springer Netherlands.
- Schwarz, E. (1928). LXXXI.—Notes on the classification of the African monkeys in the genus *Cercopithecus*, erleben. *Journal of Natural History*, 1(6), 649-663.
- Seehausen O, Butlin RK, Keller I, Wagner C. et al., (2014). Genomics and the origin of species. *Nature Rev. Genetics* 15: 176-192
- Shaffer, L. G., McGowan-Jordan, J., & Schmid, M. (Eds.). (2013). *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Shea, B. T. (1992). Ontogenetic scaling of skeletal proportions in the talapoin monkey. *Journal of Human Evolution*, 23(3), 283-307.
- Silva AA, Braga LS, Guedes RNC, Tavares MG (2015). Cytogenetic analyses using C-banding and DAPI/CMA3 staining of four populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). *Comparative Cytogenetics* 9(1): 89–102. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i1.4611
- Sineo, L. (1986). *Cariologia ed evoluzione del genere Cercopithecus* (Doctoral dissertation, Thesis-Doctorate in Anthropological Sciences, University of Florence, Biblioteche nazionali, Roma-Firenze).

- Sineo, L., Stanyon, R., & Chiarelli, B. (1986). Chromosomes of the *Cercopithecus aethiops* species group: *C. aethiops* (Linnaeus, 1758), *C. cynosurus* (Scopoli, 1786), *C. pygerythrus* (Cuvier, 1821), and *C. sabaeus* (Linnaeus, 1766). *International journal of primatology*, 7(6), 569-582.
- Sineo, L. (1990). The banded karyotype of *Cercopithecus mitis maesi* compared with the karyotypes of *C. albogularis samango* and *C. nictitans stampflii*. *International Journal of Primatology*, 11(6), 541-552.
- Sineo L. & Romagno D., 2004. Born and rise of human chromosome 7 syntenies. In Sineo L, Stanyon R (eds): *Primate Cytogenetic and Comparative Genomics*, pp 19–32. Firenze University Press, Firenze.
- Sineo, L. (2012a). The Still under Construction Cercopithecinae Phylogeny.
- Sineo, L. (2012b). Guenon Radiation is Enriched by a New Species that Demonstrates an Evolutionary Complexity with Which we are yet to Become Familiar. *J Primatol*, 1, e117.
- Slice, D. E. (Ed.). (2005). *Modern morphometrics in physical anthropology* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.
- Solano E, Castiglia R, and Capanna E (2009). Chromosomal evolution of the house mouse, *Mus musculus domesticus*, in the Aeolian Archipelago (Sicily, Italy) *Biological J. Linnean Society* 194-202. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2008.01096.
- Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T., & Tanke, H. J. (1995). Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 68(6), 2588.
- Springer, M. S., Meredith, R. W., Gatesy, J., Emerling, C. A., Park, J., Rabosky, D. L., ... & Fisher, C. A. (2012). Macroevolutionary dynamics and historical biogeography of primate diversification inferred from a species supermatrix.
- Stankiewicz, J., & de Wit, M. J. (2006). A proposed drainage evolution model for Central Africa—Did the Congo flow east?. *Journal of African Earth Sciences*, 44(1), 75-84.
- Stanyon, R., & Sineo, L. (1983). Citotassonomia e filogenesi del genere *Cercopithecus*. *Antropologia contemporanea*, 6(3), 237-252.
- Stanyon, R., Arnold, N., Koehler, U., Bigoni, F., & Wienberg, J. (1995). Chromosomal painting shows that “marked chromosomes” in lesser apes and Old World monkeys are not homologous and evolved by convergence. *Cytogenetic and Genome Research*, 68(1-2), 74-78.
- Stanyon, R., Bruening, R., Stone, G., Shearin, A., & Bigoni, F. (2004). Reciprocal painting between humans, De Brazza's and patas monkeys reveals a major bifurcation in the *Cercopithecini* phylogenetic tree. *Cytogenetic and genome research*, 108(1-3), 175-182.

- Stanyon, R., Bruening, R., Stone, G., Shearin, A., & Bigoni, F. (2005). Reciprocal painting between humans, De Brazza's and patas monkeys reveals a major bifurcation in the Cercopithecini phylogenetic tree. *Cytogenetic and genome research*, 108(1-3), 175-182.
- Stanyon, R., Rocchi, M., Capozzi, O., Roberto, R., Misceo, D., Ventura, M., ... & Archidiacono, N. (2008). Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. *Chromosome Research*, 16(1), 17-39.
- Stanyon, R., Rocchi, M., Bigoni, F., & Archidiacono, N. (2011). Evolutionary molecular cytogenetics of catarrhine primates: past, present and future. *Cytogenetic and genome research*, 137(2-4), 273-284.
- Struhsaker, T. T., Butynski, T. M., & Lwanga, J. S. (1988). Hybridization between redbellied (Cercopithecus ascanius schmidtii) and blue (C. mitis stuhlmanni) monkeys in the Kibale Forest, Uganda. *A Primate Radiation: Evolutionary Biology of the African Guenons*, 477-497.
- Tolo CU, Baranga J, Kagoro-Rugunda G. 2008. Dietary selection of L'Hoest monkeys in Kalinzu forest reserve, southwestern Uganda. *African Journal of Ecology*, 46(2), 149-157.
- Tosi, A. J., Buzzard, P. J., Morales, J. C., & Melnick, D. J. (2002). Y-chromosomal window onto the history of terrestrial adaptation in the Cercopithecini. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 15-26). Springer US.
- Tosi, A. J., Disotell, T. R., Morales, J. C., & Melnick, D. J. (2003). Cercopithecine Y-chromosome data provide a test of competing morphological evolutionary hypotheses. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27(3), 510-521.
- Tosi, A. J., Melnick, D. J., & Disotell, T. R. (2004). Sex chromosome phylogenetics indicate a single transition to terrestriality in the guenons (tribe Cercopithecini). *Journal of human evolution*, 46(2), 223-237.
- Tosi, A. J., Detwiler, K. M., & Disotell, T. R. (2005). X-chromosomal window into the evolutionary history of the guenons (Primates: Cercopithecini). *Molecular phylogenetics and evolution*, 36(1), 58-66.
- Tosi, A. J. (2008). Forest monkeys and Pleistocene refugia: a phylogeographic window onto the disjunct distribution of the Chlorocebus lhoesti species group. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(2), 408-418.
- Ukizintambara, T., & Thébaud, C. (2002). Assessing extinction risk in Cercopithecus monkeys. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 393-409). Springer US.

- Verheyen WN. 1962. *Contribution à la craniologie comparée des primates: les genres Colobus Illiger 1811 et Cercopithecus Linné 1758*. Musée royal de l'Afrique centrale.
- Viscosi, V., & Cardini, A. (2011). Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PloS one*, 6(10), e25630.
- Xing, J., Wang, H., Zhang, Y., Ray, D. A., Tosi, A. J., Disotell, T. R., & Batzer, M. A. (2007). A mobile element-based evolutionary history of guenons (tribe Cercopithecini). *BMC biology*, 5(1), 5.
- Wienberg J., Jauch A., Stanyon R. & Cremer T., 1990. Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal in situ suppression hybridization, *Genomics* 8:347–350
- Wienberg, J., & Stanyon, R. (1998). Comparative chromosome painting of primate genomes. *ILAR Journal*, 39(2-3), 77-91.
- Wilkinson, D. G. (1998). *In situ hybridization: a practical approach*. Oxford University Press.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Academic Press.
- Zihlman AL, Underwood CE. 2013. Locomotor Anatomy and Behavior of Patas Monkeys (*Erythrocebus patas*) with Comparison to Vervet Monkeys (*Cercopithecus aethiops*), *Anatomy Research*
- Zuberbühler, K. (2002). Effects of natural and sexual selection on the evolution of guenon loud calls. In *The Guenons: Diversity and Adaptation in African Monkeys* (pp. 289-306). Springer US.

7. ALLEGATI

7.1 TABELLE

Tabella 1. Confronto tra le più recenti tassonomie.

GENUS	SPECIES GROUP	SPECIES	CODE	GROVES (2001)	GRUBB ET AL. (2003)	OTHERS (see text)
<i>Allenopithecus</i>		<i>Allenopithecus nigroviridis</i> (1907)	ANI	X	X	X
<i>Miopithecus</i>		<i>M. ogouensis</i> (1997)	MOG	X	X	X
		<i>Miopithecus talapoin</i> (1774)	MTA	X	X	X
<i>Allochrocebus</i>						X
	lhoesti	<i>Allochrocebus lhoesti</i> (1899)	ALH	X	X	X
		<i>A. preussi</i> (1898)	APR	X	X	X
		<i>A. solatus</i> (1988)	ASO	X	X	X
<i>Erythrocebus</i>		<i>Erythrocebus putas</i> (1775)	EPA	X	X	X
<i>Chlorocebus</i>				X		X
	aethiops	<i>Chlorocebus aethiops</i> (1758)	CAE	X	X	X
		<i>C. cynosuros</i> (1786)	CCY	X		X
		<i>C. djambjambensis</i> (1902)	CDJ	X		X
		<i>C. pygerythrus</i> (1821)	CPY	X		X
		<i>C. sabaesus</i> (1758)	CSA	X		X
		<i>C. tantalus</i> (1841)	CTA	X		X
<i>Cercopithecus</i>	dryas	<i>C. dryas</i> (1932)	CDR	X	X	X
	hamlyni	<i>C. hamlyni</i> (1907)	CHA	X	X	X
		<i>C. lomamiensis</i> (2012)	CLO			X
	diana	<i>C. diana</i> (1758)	CDI	X	X	X
		<i>C. roloway</i> (1774)	CRO	X		X
	neglectus	<i>C. neglectus</i> (1876)	CNE	X	X	X
	mona	<i>C. mona</i> (1774)	CMO	X	X	X
		<i>C. campbelli</i> (1838)	CCA	X	X	X
		<i>C. denti</i> (1907)	CDE	X		X
		<i>C. lowei</i> (1923)	CLO	X		X
		<i>C. pogonias</i> (1833)	CPO	X	X	X
		<i>C. wolffi</i> (1891)	CWO	X		X
	mitis	<i>C. mitis</i> (1822)	CMI	X	X	X
		<i>C. albigularis</i> (1831)	CAL	X		X
		<i>C. doggetti</i> (1907)	CDO	X		X
		<i>C. kandri</i> (1905)	CKA	X		X
		<i>C. nictitans</i> (1776)	CNI	X	X	X
	cephus	<i>C. cephus</i> (1758)	CCE	X	X	X
		<i>C. ascanius</i> (1799)	CAS	X	X	X
		<i>C. erythrogaster</i> (1866)	CERY	X	X	X
		<i>C. erythrotis</i> (1838)	CER	X	X	X
		<i>C. petaurista</i> (1774)	CPE	X	X	X
		<i>C. sclateri</i> (1904)	CSC	X	X	X

Tabella 2. Confronto tra le più recenti datazioni per la divergenza delle tribù Papionini e Cercopithecini.

PAPIONINI - CERCOPITHECINI DIVERGENCE		
EPOCH	DATING (MYA)	PAPER
Middle Miocene	14 – 11	Benefit, 1999
Late Miocene	10	Groves, 2001
Middle – Late Miocene	13, 5 – 10, 5	Disotell & Raaij, 2002
Middle – Late Miocene	12, 9 – 10,3	Raaij et al., 2005
Middle Miocene	11,5	Tosi et al., 2005
Late Miocene	11	Xing et al., 2007
Middle Miocene	11,5	Perelman et al., 2011
Middle – Late Miocene	15 – 9,6	Guschanski et al., 2013
Middle – Late Miocene	13,9 – 9,2	Gilbert et al., 2014
Early Miocene	18,6	Chatterjee et al., 2009

Tabella 3. Confronto tra le più recenti datazioni per la comparsa dei generi *Allenopithecus* e *Miopithecus*.

Autori	DATAZIONI (ma)			
	DIVERGENZA ANI - MTA	COMPARS ANI	COMPARS MTA	COMPARS ALTRI GENERI
Disotell & Raaum, 2002	9,5			8,5 – 7,5
Tosi et al., 2005		9,3		8,1
Perelman et al., 2011	8,22	7,63	7,28	6,16
Guschanski et al., 2013	9,6	9,6 - 9,3	9,6 - 9,3	7,4 – 6,8
Haus et al., 2013	8,8			

Tabella 4. Lista dei Landmarks sul Cranio.

NORMA SUPERIORE	
1	Inion (I): il punto più arretrato del cranio
2	Lambda (L): intersezione tra le suture sagittale e lambdoidea
3	Bregma (B): intersezione tra le suture coronale e sagittale
4	Eurion (EU): il punto più laterale del neurocranio
NORMA LATERALE	
5	Bordo posteriore del meato acustico
6	Bordo anteriore del meato acustico
7	Cavità glenoidea
8	Il punto più basso del processo zigomatico dell'osso temporale
9	Zygion (ZY): il punto più esterno dell'arco zigomatico
10	Zigotemporale inferiore (ZTi): punto latero-inferiore della sutura zigomatico-temporale sulla porzione laterale dell'arco zigomatico
11	Zigo-max inferiore: punto antero-inferiore della sutura zigomatico-mascellare
12	Il punto superiore dell'arco mascellare
13	Il punto superiore dell'arco zigomatico
14	Zigotemporale superiore (ZTs): punto superiore della sutura zigomatico-temporale sulla porzione laterale dell'arco zigomatico
15	Massima curvatura del margine antero-superiore dell'arco zigomatico
16	Punto di incontro dell'arco zigomatico e dell'alisfenoide sul margine superiore della fessura pterygo-mascellare
17	Frontomolare temporale (FMT): intersezione tra la sutura frontozigomatica e il bordo laterale dello zigomo
18	Frontotemporale (FT): punto anteriore della linea temporale
NORMA FRONTALE	
19	Il punto più alto dell'orbita (forame sopraorbitale)
20	Frontomolare orbitale (FMO): intersezione tra la sutura frontozigomatica e il bordo interno dell'orbita
21	Il punto più basso dell'orbita
22	Zigo-max superiore (ZMs): punto antero-superiore della sutura zigomatico-mascellare sul bordo orbitale
23	Maxillofrontale (MF): intersezione tra la sutura fronto-mascellare e il bordo interno dell'orbita
24	Glabella (G): il punto centrale sulla linea dei frontali al livello dell'arco sopraorbitale
25	Nasion (N): punto centrale della sutura fronto-nasale
26	Rhinion (RHI): il punto centrale anteriore dei nasali
27	Alare (AL): punto più laterale dell'apertura piriforme
28	Nasospinale (NS): punto inferiore dell'apertura piriforme
NORMA LATERALE	
29	Subspinale (SS): punto intermedio tra il nasospinale e il prosthion
30	Prosthion (PR): punto esterno centrale sul processo alveolare delle mascelle
31	Prosthion2 (PR2): punto pre-mascellare, equivalente al prosthion but tra l'incisivo centrale e il laterale
32	I2-C: il punto anteriore dell'alveolo dell'incisivo laterale
33	Il punto anteriore dell'alveolo del canino
34	Il punto posteriore esterno dell'alveolo del canino, proiettato labialmente sul margine alveolare
35	P3-P4

36	P4-M1	Punti di contatto tra pre-molari/molari adiacenti
37	M1-M2	proiettati labialmente sul margine alveolare
38	M2-M3	
39	il punto posteriore dell'alveolo dell'M3	
NORMA INFERIORE		
40	Il punto posteriore centrale sul margine alveolare di M3	
41	M3 – M2	
42	M2– M1	Punti di contatto tra pre-molari/molari adiacenti
43	M1 – P4	proiettati lingualmente sul margine alveolare
44	P4 – P3	
45	Il punto posteriore interno dell'alveolo del canino	
46	Il punto anteriore interno dell'alveolo del canino	
47	Il punto anteriore interno dell'alveolo dell'incisivo laterale	
48	Punto di contatto tra gli incisivi laterali, proiettati lingualmente sul margine alveolare	
49	Punto di contatto tra gli incisivi centrali, proiettati lingualmente sul margine alveolare	
50	Il punto posteriore del forame degli incisivi	
51	Punto di intersezione centrale tra la mascella e l'osso palatino	
52	Punta posteriore della spina nasale	
53	Punto di massima curvatura sul bordo posteriore dell'osso palatino	
54	Punto di intersezione centrale tra il basisfenoide e il basioccipitale	
55	Basion (B): punto anteriore del forame magno	
56	Opisthion (O): punto posteriore del forame magno	
57	Estremità posteriore del condilo occipitale, lungo il margine del forame magno	
58	Punto di intersezione tra il basisfenoide, il basioccipitale e la rocca petrosa dell'osso temporale	
59	Punto di intersezione tra la rocca petrosa dell'osso temporale, l'alisfenoide e la base del processo zigomatico dell'osso temporale	
60	Estremità distale del foro giugulare	
61	Punto posteriore sulla curvatura del margine anteriore del processo zigomatico dell'osso temporale	

Tabella 5. Lista dei Landmarks sulla Mandibola.

NORMA LATERALE	
1	Punto superiore del processo coronoide
2	Punto inferiore dell'incisura mandibolare
3	Kondylion mediale (KDM): Punto mediale sulla superficie condilare della mandibola
4	Kondylion laterale (KDL): Punto laterale sulla superficie condilare della mandibola
5	Rientranza nel punto mediale del ramo mandibolare
6	Gonion (GO): Punto posteriore dell'angolo goniaco
7	Solco per l'aggancio dei masseteri sul margine antero-inferiore dell'angolo goniaco
8	Solco per l'aggancio del muscolo trasverso del mento, sotto il foro mentale
9	Mentale (MT): bordo anteriore del foro mentale
10	Punto mediale della protuberanza mentale
11	Infradentale (ID): Punto anteriore esterno della mandibola tra gli incisivi centrali
12	Punto mediale esterno della mandibola tra gli incisivi laterali
13	Punto mediale esterno della mandibola tra l'incisivo laterale e il canino
14	Punto posteriore dell'alveolo del canino
15	Punto anteriore sull'alveolo del P3, proiettati labialmente sul margine alveolare
16	P3 – P4
17	P4 – M1 Punti di contatto tra pre-molari/molari adiacenti
18	M1 – M2 proiettati labialmente sul margine alveolare
19	M2 – M3
20	Linea obliqua
NORMA SUPERIORE	
21	Foro mandibolare

22	Punto centrale posteriore sul margine alveolare del M3
23	M3 – M2
24	M2 – M1 Punti di contatto tra pre-molari/molari adiacenti
25	M1 – P4 proiettati lingualmente sul margine alveolare
26	P4 – P3
27	Punto anteriore sull'alveolo del P3, proiettato lingualmente sul margine alveolare
28	Punto posteriore dell'alveolo del canino, proiettato lingualmente sul margine alveolare
29	Punto mediale interno della mandibola tra l'incisivo laterale e il canino
30	Punto mediale interno della mandibola tra gli incisivi laterali
31	Punto anteriore interno della mandibola tra gli incisivi centrali
32	Punto di inserzione del muscolo genioglosso (punto centrale posteriore sul bordo superiore, dietro gli incisivi)
33	Punto di inserzione del muscolo genioioideo (punto centrale posteriore sul bordo inferiore, dietro gli incisivi)

Tabella 6. Lista dei landmarks compresi nel dataset “Neurocranio-Facciale”.

1	Inion (I): il punto più arretrato del cranio
2	Lambda (L): intersezione tra le suture sagittale e lambdoidea
3	Bregma (B): intersezione tra le suture coronale e sagittale
4	Eurion (EU): il punto più laterale del neurocranio
12	Il punto superiore dell'arco mascellare
17	Frontomolare temporale (FMT): intersezione tra la sutura frontozigomatica e il bordo laterale dello zigomo
18	Frontotemporale (FT): punto anteriore della linea temporale
19	Il punto più alto dell'orbita (forame sopraorbitale)
20	Frontomolare orbitale (FMO): intersezione tra la sutura frontozigomatica e il bordo interno dell'orbita
21	Il punto più basso dell'orbita
22	Zigo-max superiore (ZMS): punto antero-superiore della sutura zigomatico-mascellare sul bordo orbitale
23	Maxillofrontale (MF): intersezione tra la sutura fronto-mascellare e il bordo interno dell'orbita
24	Glabella (G): il punto centrale sulla linea dei frontali al livello dell'arco sopraorbitale
25	Nasion (N): punto centrale della sutura fronto-nasale
26	Rhinion (RHI): il punto centrale anteriore dei nasali
27	Alare (AL): punto più laterale dell'apertura piriforme
28	Nasospinale (NS): punto inferiore dell'apertura piriforme
29	Subspinale (SS): punto intermedio tra il nasospinale e il prosthion
30	Prosthion (PR): punto esterno centrale sul processo alveolare delle mascelle

Tabella 7. Lista dei crani campionati, suddivisi per sesso ed età.

GENUS	SPECIES	CODE	CRANIA					
			FEMALE	MALE	UNKNOWN	INFANT	JUVENILE	ADULT
<i>Allenopithecus</i>	<i>nigroviridis</i>	ANI	-	2	-	1	-	1
<i>Miopithecus</i>	<i>ogouensis</i>	MOG	4	3	1	-	1	7
	<i>talapoin</i>	MTA	1	6	4	2	2	7
<i>Allochrocebus</i>	<i>lhoesti</i>	ALH	8	4	1	-	1	12
	<i>solatus</i>	ASO	1	2	-	-	1	2
<i>Erythrocebus</i>	<i>patas</i>	EPA	15	23	23	9	30	22
<i>Chlorocebus</i>	<i>aethiops</i>	CAE	18	37	29	9	32	43
	<i>cynosuros</i>	CCY	7	3	3	-	6	7
	<i>djamdjamensis</i>	CDJ	5	2	-	2	2	3

	<i>pygerythrus</i>	CPY	62	91	15	4	41	123
	<i>sabaeus</i>	CSA	17	21	42	8	32	40
	<i>tantalus</i>	CTA	4	6	8	3	7	8
<i>Cercopithecus</i>	<i>albogularis</i>	CAL	19	13	7	2	10	27
	<i>ascanius</i>	CAS	19	23	2	6	12	26
	<i>campbelli</i>	CCA	16	11	10	4	7	26
	<i>cephus</i>	CCE	26	20	9	5	18	32
	<i>denti</i>	CDE	-	-	2	-	-	2
	<i>diana</i>	CDI	13	12	8	7	5	21
	<i>erythrogaster</i>	CERY	-	2	-	-	-	2
	<i>erythrotis</i>	CER	-	2	-	1	-	1
	<i>hamlyni</i>	CHA	6	6	5	4	1	12
	<i>lowei</i>	CLO	5	2	4	1	3	7
	<i>mitis</i>	CMI	15	13	2	2	8	20
	<i>mona</i>	CMO	7	10	9	1	11	14
	<i>neglectus</i>	CNE	3	11	2	1	1	14
	<i>nictitans</i>	CNI	15	9	15	3	12	24
	<i>petaurista</i>	CPE	20	18	28	7	20	39
	<i>pogonias</i>	CPO	8	11	15	6	11	17
	<i>roloway</i>	CRO	5	7	2	1	5	8
	<i>sclateri</i>	CSC	-	-	1	-	-	1
	<i>wolfi</i>	CWO	1	1	-	-	1	1
	<i>spp</i>	CSP	6	16	64	3	29	54
<i>Cercocebus</i>	<i>atys</i>	CAT	6	4	-	-	4	6
	<i>galeritus</i>	CGA	3	-	-	-	-	3
	<i>torquatus</i>	CTO	8	8	2	-	7	11
<i>Colobus</i>	<i>guereza</i>	CGU	7	4	20	-	2	29
<i>Macaca</i>	<i>fascicularis</i>	MFA	5	4	1	-	3	7
	<i>fuscata</i>	MFU	1	4	-	1	1	3
	<i>mulatta</i>	MMU	7	7	-	-	6	8
	<i>silenus</i>	MSI	1	2	-	-	-	3
	<i>sylvanus</i>	MSY	2	-	1	-	1	2
	<i>sp</i>	MSP	-	-	1	-	1	-
<i>Pongo</i>	<i>pygmaeus</i>	PPY	1	1	-	-	-	2
<i>Homo</i>	<i>sapiens</i>	HSA	-	2	-	-	-	2

Tabella 8. Lista delle specie con un differente numero di mandibole rispetto ai crani.

GENUS	SPECIES	CODE	MANDIBLES					
			FEMALE	MALE	UNKNOWN	INFANS	JUVENILE	ADULT
<i>Miopithecus</i>	<i>talapoin</i>	MTA	1	6	3	2	2	6
<i>Erythrocebus</i>	<i>patas</i>	EPA	15	23	21	9	29	21
<i>Chlorocebus</i>	<i>aethiops</i>	CAE	18	37	25	9	31	40
	<i>pygerythrus</i>	CPY	59	90	13	3	39	120
	<i>sabaeus</i>	CSA	17	20	40	8	31	38
	<i>tantalus</i>	CTA	4	6	6	3	6	7
<i>Cercopithecus</i>	<i>diana</i>	CDI	12	12	6	5	4	21

<i>hamlyni</i>	CHA	5	6	5	3	1	12
<i>mona</i>	CMO	7	10	8	1	11	13
<i>neglectus</i>	CNE	3	11	1	1	1	13
<i>nictitans</i>	CNI	15	8	15	3	12	23
<i>petaurista</i>	CPE	19	18	27	7	19	38
<i>pogonias</i>	CPO	7	11	14	4	11	17
<i>spp</i>	CSP	3	10	44	1	24	32

Tabella 9. Variabile “Species Groups”: suddivisione delle specie del genere *Cercopithecus* campionate in 5 raggruppamenti (Hill, 1966).

<i>cephus</i>	<i>diana</i>	<i>hamlyni</i>	<i>mitis</i>	<i>mona</i>	<i>neglectus</i>
<i>ascanius</i>	<i>diana</i>	<i>hamlyni</i>	<i>albogularis</i>	<i>campbelli</i>	<i>neglectus</i>
<i>cephus</i>	<i>roloway</i>		<i>mitis</i>	<i>denti</i>	
<i>erythrotis</i>			<i>nictitans</i>	<i>lowei</i>	
<i>erythrogaster</i>				<i>mona</i>	
<i>petaurista</i>				<i>pogonias</i>	
<i>sclateri</i>				<i>wolfi</i>	

Tabella 10. Variabile “GeoLocalizzazione”: collocazione delle specie del genere *Cercopithecus* nelle tre aree (Ovest, Centro e Est) in cui è possibile suddividere il continente Africano. Modificata da Colyn (1991) e Rowe et al. (1996).

OVEST (Liberia - Ovest Nigeria)	CENTRO (Est Nigeria - Gabon)	EST (Est/Sud Congo)
<i>campbelli</i>	<i>cephus</i>	<i>albogularis</i>
<i>diana</i>	<i>neglectus</i> *	<i>ascanius</i>
<i>erythrotis</i>	<i>pogonias</i> *	<i>denti</i>
<i>erythrogaster</i>		<i>hamlyni</i>
<i>lowei</i>		<i>mitis</i>
<i>mona</i>		<i>wolfi</i>
<i>nictitans</i>		
<i>petaurista</i>		
<i>roloway</i>		
<i>sclateri</i>		

*Le specie *neglectus* e *pogonias* si ritrovano anche all'interno del bacino del Congo.

7.2 PROTOCOLLI DI LABORATORIO

BANDEGGIO G

- Sciogliere 1,25 ml di Tripsina in 100 ml PBS (Soluzione al 20%).
- Versare 2 ml d-glucose in 100 ml HBSS.
- Preparare una soluzione di Giemsa con 10% Sorensen's e 2% giemsa (per un coplan da 50 ml: 2,5 ml of buffer KH_2PO_4 + 2,5 ml of buffer Na_2HPO_4 + 1 ml Giemsa + dH_2O fino a 50 ml).
- Versare la tripsina sul vetrino per 2', sciacquare in HBSS per 15'' e inserire il vetrino nella giemsa per 30'.
- Sciacquare vigorosamente in dH_2O .

BANDEGGIO C

- Incubare il vetrino per 10-15' in HCl 0.1 N a RT.
- Sciacquare con dH_2O .
- Versare l'Idrossido di Bario nella dH_2O a 60° , finché non precipita.
- Incubare nella soluzione di bario a 60° per 10-12'.
- Sciacquare vigorosamente con acqua acidifica per 2-3 volte.
- Asciugare.
- Opzione 1: Incubare in 2xSSC per 45-60'.
- Opzione 2 (*slow method*): versare il 2xSSC (circa 4 gocce con una pipetta pasteur) sopra una parte del vetrino, indi con la pinzetta coprirlo col coprioggetto.
- Inserirlo in camera umida a 37° ON.
- Staccare il coprioggetto e subito sciacquare in dH_2O .
- Inserire in Giemsa 4% - Sorensen's buffer a pH 6.8 per 30'.
- Sciacquare in dH_2O e lasciare asciugare.

BANDEGGIO Ag-NOR

- Versare 1g di AgNO_3 in 2ml H_2O .
- Preparare una soluzione con 1g di gelatina + 0,5 ml di acido formico in 50ml H_2O .
- Versare 5 gocce di nitrato sul vetrino, seguite da 3 gocce di gelatina.
- Coprire con coprioggetto e disporre sulla piastra pre-riscaldata a $50/60^\circ$ per 1'30''.
- Sciacquare il vetrino in dH_2O .

IBRIDAZIONE FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

Precipitazione sonde:

- Biotina 10 ul
- COT DNA 5 ul
- Salmon Sperm 2 ul
- Sodio acetato 3M 3,2 ul (1/10 delle altre componenti)
- Etanolo 100% freddo 88 ul < x < 105, 6 ul = 100 ul (da 2,5 a 3 volte la somma delle altre componenti)

Lavaggio sonde:

- In centrifuga per ~30' a 13.1 rpm.
- Svuotare le eppendorf e aggiungere 200/300 ul (200 per le epp. da 0,25 - 300 per le epp. da 0,5) di etanolo 70% freddo in ognuna.
- Vortex + centrifuga per 3'.
- Eliminare il supernatante, svuotando l'eppendorf.
- Mettere sul thermoblock a 44° per far evaporare tutto l'alcol.

- Vortexare l'HB e aggiungerne 13 ul. Indi azionare il vortex per qualche minuto (5-10').
- Centrifugare pochi istanti ed inserire le eppendorf nella PCR machine, programma Probe: 80° [Anche 65° per 20' vanno bene] (per denaturare le eliche) per 10' + 37° per >1h (per favorire l'ibridazione).
- Misurare 13 ul di sonda e versarla sul vetrino. Indi incollare tutti i bordi con la fixogum.
- Inserire in una camera umida a 37° ON.
- Detection vetrini:
- Impostare il bagno a 44° ed inserirvi 3 coplan con Formamide 50%, 2 x SSC, 4x SSC.
- Appena si raggiunge la temperatura, inserire i vetrini per 10' nella Formamide.
- Spostarli nel 2 x SSC per 15'.
- Infine passarli nel 4xSSC per 5'.
- Trascorsi i 5', lasciare sgocciolare i vetrini fuori dal coplan.

FISH INDIRECTA

- *opzione 1:* Misurare 200 ul di block solution 10% per vetrino. Versarli sul vetrino. Inserire in camera umida per 15'. Togliere il parafilm e seguire i passaggi dell'opzione 2.
- *opzione 2:* Aggiungere 1 ul di anticorpo antibiotina per ogni 100 ul di block 1% e 1 ul di anticorpo antidigoxigenina ogni 200 ul di block 1%. Versare 180 ul di soluzione (block 1% + anticorpi) sul vetrino. Coprire con parafilm e inserire in camera umida a 37° per >45'. Immergere i vetrini al buio nel 4xSSC (T ~ 30°) per 15', sciacquarli velocemente in dH₂O e poi lasciarli asciugare.

FISH DIRETTA:

Misurare 50 ul di soluzione DAPI + ANTIFADE e distribuirne 2 gocce sul vetrino. Quindi chiudere con coprioggetto e riporre nel portavetrino in frigo.

7.3 PUBBLICAZIONI

1) Articolo: “*Geometric morphometrics highlights skull affinities in Cercopithecini*” (Stefania Lo Bianco, Roberto Micciché and Luca Sineo). Submitted to PeerJ.

Abstract

The tribe Cercopithecini is a large and colorful taxon of African primates. The evolutionary relationships inside the tribe are controversial, as are the numbers of genera and species. Several past studies identified two groups inside the tribe, an arboreal group and a terrestrial one. This dichotomy has often been accepted passively, with effective consequences for the interpretation of phylogenetic analyses. Nevertheless, the ecology of these species is much more complex than it appears.

Because skeletal features are very informative about species attitudes, we conducted a geometric morphometric survey on 1126 skulls of 42 Catarrhini species. We performed principal component analyses to identify the most extreme differences in cranial and mandibular shapes, to test the morphometric independence and validity of the taxa *Chlorocebus* and *Allochrocebus* and to investigate the existence of arboreal or terrestrial features on Cercopithecini skulls.

We recognized four clear sister genera inside the tribe, *Allenopithecus*, *Miopithecus*, *Erythrocebus* and *Cercopithecus*, which showed cranial differences mainly in facial bone height and neurocranial length. With respect to the mandibles, we noted that the length of the bodies and rami influenced the clustering of genera. *Chlorocebus* and *Allochrocebus* mildly differed from the morphometric shape of genus *Cercopithecus* skull in facial bone and mandibular rami heights. The clustering highlighted relies more on size and diet than on arboreal and terrestrial attitudes.

Allenopithecus is morphometrically coherent with the tribe, but the mean shape analyses confirm its distinctive placement. The genera *Miopithecus* and *Erythrocebus* are distinct from the other Cercopithecini, indicating independent sizes and evolutionary events. Our study does not support the existence of *Chlorocebus* and *Allochrocebus* as independent genera because they morphometrically cluster inside the genus *Cercopithecus*. It was not possible to investigate up to the species level, especially the skull shape of the *Cercopithecus* species groups is uniform as a consequence of their recent and color-based radiation.

The morphometric methodology is usually preferred for analyses between taxa with deep morphometric differences or long evolutionary distances. Nevertheless, the clustering of the tribe Cercopithecini in sister genera is supported by geometric morphometrics.

Keywords: Cercopithecini; Guenons; Dichotomy; Arboreal; Terrestrial; Geometric Morphometrics; Shape; Crania and Mandibles.

2) Articolo: “*The evolution of Cercopithecini: dialectic between conservatism and radicalism*” (Stefania Lo Bianco, Judith Masters and Luca Sineo). Submitted to Evolutionary Anthropology.

Abstract

The tribe Cercopithecini encompasses a relatively recent radiation of mainly arboreal African primates, the guenons. In terms of both species and genera, and despite minor differences of taxonomic opinion, the tribe comprises by far the most diverse clade of catarrhines. The component taxa, however, are skeletally highly conservative and often difficult to distinguish in the absence of the pelage. As in all catarrhines, communication at a distance is visually and vocally mediated, but as most guenons dwell in rainforests with limited light transmission through the canopy, their species identity is encoded, not as gross anatomical differences, but

in vibrantly colored patterns of the skin on the face and genital regions, in addition to distinctive vocalizations. Postcranially, they have an undistinguished, generalist morphology mainly conducive to arboreal activity, but equally suitable for agile terrestrial movements. In contradistinction to their phylogenetic diversity, their diversity at the DNA sequence level is also remarkably low in closely related taxa, complicating the reconstruction of relationships. There is, however, one character suite in which cercopithecins show extensive variation, and that is in their karyotypes. The evolution of the clade has involved extensive fissioning and reorganization of the chromosome complement, potentially providing a crucial record of the sequence of lineage divergences. We review recent insights into cercopithecine genomic evolution and reorganization, and compare genome-level dynamics with information generated by molecular sequence and morphological studies. We contextualize the phylogenetic pattern of guenon diversification relative to Africa's geotectonic and paleoclimatic evolution.

Keywords: Cercopithecini; Guenons; Chromosomes; Phylogeny; Evolution.

3) Editoriale: “*Evidence of a chromosomal polymorphism unique to Cercopithecini. A key factor in the Tribe definition?*” (Sineo Luca, Lo Bianco Stefania and Barbara Picone). *J Primatol* 4: e136. doi:10.4172/2167-6801.1000e136.

There are obvious gaps in the comprehension of genomic mechanisms leading to speciation (Sehausen et al., 2014). This arises the question: “Are genetic differences and polymorphism highly responsible in the species isolation mechanisms? Despite many efforts, it might be fundamental collect evidences and bringing more examples in the discussion. Nevertheless, the existence of alternative and incompatible species concepts reflects a basic disagreement about the nature of species. By introducing the biological species concept, Mayr (1969) stated that the species is an assemblage of interbreeding natural populations reproductively isolated. Cracraft (1989) proposed the phylogenetic species concept affirming that a species is a monophyletic cluster of organisms, a prelude to the ontological concept of Christoffersen (1995) that defines the species as the product of a single lineage evolution in a interbreeding history. Species, as concrete biogeographical entity, has a genetic base that limits its essence and protects its existence. Genetic and chromosomal barriers are important in the limitation of fertility and in the arose of varieties and species in animals and plants (Solano et al., 2009; Lowry and Willis, 2010; Silva et al., 2015). Conversely, several examples, like Tribe Papionini in Primates, indicate that species differentiation is not necessarily related to genomic differences and/or levels of genetic variability and chromosomal polymorphism. Both variability and polymorphism are highly scrutinized by the natural selection. According to human genetics studies (the largest body of information on genetic variability we have assembled analysing ourselves), humans (HSA) have a level of endured polymorphism in their karyotype. This polymorphism is restricted to the quantitative expression of autosomal heterochromatic traits in pericentromeric areas, or in the expression of NOR's districts, or in the HSA specific Y chromosome q-arm; polymorphism associated to balanced inversions are rare, and unbalanced translocations are strongly selected. Intrinsic genetic mechanisms work well in the protection of species identity. On the other side, intrinsic genetic barriers are evidently not necessary in potentially interfertile sympatric species that are reproductively isolated by behavioural mechanisms (sympatric *Macaca* species with identical genome organization in 42 homologous chromosomes, maintain their reproductive isolation). Even if it is possible to describe “local” break down in reproductive isolation either in captivity and/or in nature, there is still a open discussion on the (rare) efficacy of hybridization in species creation. Karyotype assemblage and chromosome features assume a potential importance in speciation. Molecular chromosome studies are certainly a tool in phylogenetic studies (Nadeau and Taylor, 1984; Prevzner and Tesler, 2003; Murphy et al., 2005).

If in Papionini (see above discussion) the speciation event is not related to chromosomal changes, and species maintain their isolation, using rigid behavioural schemes, in Cercopithecini, chromosomal rearrangements have played a fundamental role in the birth and separation of populations. *Cercopithecus* and related species are important models for the study of primate evolution during the Plio-Pleistocene. The group includes genera and species characterised by facial patterns, various ecological distribution, and a vivacious reshuffling of chromosomal features in the different species or in different Species-Group (Hill, 1966). Some plesiomorphic character like “catamenial swelling” in *Allenopithecus* or *Miopithecus* challenge the classical composition of the tribe and indicate a weak phylogenetic relationship of these genera with real guenons. It is known that Cercopithecini Tribe are characterised by a fission-fusion model of chromosomal evolution, and that some synteny disruption occurred in different species with different mechanisms (Romagno et al., 2000). The intense chromosomal diversity among species has been interpreted as a motif of speciation (reproductive barriers), together with biogeographical clusterization in the African geography.

4) Articolo: “*Chromosome studies in North-Western Sicily males of Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Curculionidae: Dryophthorinae)” (Antonella Lannino, Luca Sineo, Stefania Lo Bianco, Vincenzo Arizza and Barbara Manachini). Submitted to Bulletin of Insectology.

Abstract

Rhynchophorus ferrugineus, known as Red Palm weevil (RPW) was accidentally introduced and established in Sicily (Italy) since 2005. As like in other Mediterranean sites, this insect has been causing extensive damage to palm trees and in Mediterranean countries on its new host *Phoenix canariensis* (Canary Island palms), acquired concomitantly with the colonization of the area. This species demonstrate a good ecological plasticity and slightly but significant morphological polymorphism (colour patterns and length of the rostrum in male individuals) that can be appreciated within different geographical populations. The aim of the present work was to investigate if this ecological plasticity and phenotypic variability can be accompanied by features in chromosomes like changes in diploid number or chromosome morphology, when compared to other RPW populations. Literature data on karyotype analysis does not reveal any difference in the diploid number ($2n=22$). In this paper, the karyotypes of different morphotypes of RPW Sicilian populations, collected from *P. canariensis*, were analysed using conventional staining, C-banding and sequential staining with the fluorochromes chromomycin-A3/4-6-diamidino-2-phenylindole (CMA3/ DAPI).

The analyses of metaphases obtained from the testes of adults showed that the species has $2n = 22$ chromosomes, with 10 autosomal pairs and a sex chromosome pair. The eu-heterochromatic composition investigated with CTG banding, Dapi, cma3, and NOR do not indicate any peculiarity in the populations investigated. *R. ferrugineus* has a Coleoptera Curculionoidea chromosomal asset and functional compartmentalization. *R. ferrugineus* presents a karyotype with intermediate characteristics between Dryophthorinae and Curculioninae such as micro Y chromosome and the typical "sphere-shape" of the sexual bivalent in prophase -I or after C-banding.

Keywords: Red Palm Weevil, polymorphisms, karyotype, alternative host plant, invasive species.

What if the Cercopithecini in addition to an highly diploid variation, have a “tribal-specific” chromosomal polymorphism? Cercopithecini tribe is characterised by a HSA20/21 syntenic association (Stanyon et al., 2008), an apomorphic trait acquired during the primate evolution.

Interestingly, this synteny, constructed by two small human orthologous, can be found in two forms (heteromorphism), in homozygosis or frequently in heterozygosis in different species.

The first description of this chromosomal polymorphism was in occasion of a GTG banding on a *C. nictitans* from the Zoo of Barcelona (Ponsà and Egozcue, 1981). Subsequently, a second report was on a *C. nictitans stampflii* from the Zoo of Zurich (Sineo et al., 1986). This polymorphism was then investigated in other guenons of the same Superspecies group with widely dispersed distribution: *C. mitis maesi* and *C. albogularis labiatus*, animals coming from South African facilities and from the Transvaal forests respectively (Sineo, 1990). On the base of GTG banding this polymorphism was described as a pericentric inversion followed by a paracentric inversion. The pericentric inversion hypothesis seems confirmed by molecular cytogenetics data on other guenons like *C. petaurista* and other species in the campbelli and cephus species group (unpublished data), although a more intriguing hypothesis of a Evolutionary New Centromere (i.e. the activation of centromeric silenced sequences) has been recently proposed by Stanyon and colleagues (Rocchi et al., 2012).

The scrutiny of literature data suggests the presence of the same polymorphic trait even in other Cercopithecoidea related to the genus *Cercopithecus* (O'Brien et al., 2006; Moulin et al., 2008). The presence of this polymorphism in different species could be a symptom of particular chromosomal dynamics for this syntenic association, and not a result of speciation and genetic drift (Kirkpatrick and Barton, 2006). Chromosome 21 in humans is a gene poor chromosome with vast areas of duplication and, interestingly, does not contain Fragile Sites. Chromosome 22 is richer of important genes and has only one rare Fragile Sites in its length. The inversion (or the ENC, if defined in future by molecular approaches), has presumably derived from a common ancestor in Cercopithecoidea. In the hypothesis of an inversion, these mechanisms spread because they prevent recombination from breaking apart sets of alleles that work well in an ecological or sexual setting. Since recombination continues normally within the populations of inverted and uninverted chromosomes, inversions may escape many of the deleterious consequences suffered by other genetic mechanisms that shut down recombination entirely (Otto and Lenormand, 2002). In many species, including plants, fungi, insects and humans, there is evidence that inversions respond to natural selection; however few genes or other chromosomal features that are the results of selections have been ambiguously identified. Thus the mechanisms that affect most of the inversions remain unknown (Hoffman and Reisenberg, 2008). A part from the molecular mechanism involved in this heteromorphism, our interest is in the phyletic meaning of this peculiarity, in the hypothesis that this polymorphism predates speciation, a very interesting situation that could be symptom of a gene flow and of phylogenetic and chronologic vicinity within the species in the Tribe. The sporadic but distributed frequency of this polymorphism is unusual and seems the first case of chromosomal polymorphism involving different related-species in a Primates genus and in its sister genera. Tribe Cercopithecini offers a great variety of interesting parameters that should be carefully interpreted in the light of a multidisciplinary approach and of a re-defined ecological framework to its evolution.

5) Presentazione orale: “*Faces and Identities: is it possible measuring the reliability of the 3D craniofacial approximations?*” (Roberto Micciché, Daniele Di Lorenzo, Giuseppe Carotenuto, Stefania Lo Bianco, Pietro Valenti and Luca Sineo). 21° Congresso dell’Associazione Antropologica Italiana, Ravenna, 3-5/09/15.

Abstract

The craniofacial approximation (CFA) is largely used in forensic identification of unknown skeletonized bodies. Despite numerous forensic reports have proved successful in identifying a cadaver, it is very hard to assess the reliability of CFA methods.

The present work aims to evaluate the accuracy of CFAs through the comparison of a blind facial approximation with a simultaneous faces array test. The blind CFA was made following the Manchester's protocol.

In our test the CFA was compared with a photographic array of ten faces, included the photo of the individual whom belonged the skull. The positive recognition was evaluated by a total of 320 unfamiliar assessors. During the test a survey was also conducted to evaluate which facial feature mostly drive the process of identification.

The true positive recognition showed extremely poor results. Only the 5% of assessors match the CFA with the target individual photo. The nose was judged the most influential facial feature, but it is also the most problematic anatomical district to approximate due to the lack of strong relationships with the bony part of the skull.

Our results seem to highlight clear limits in positive recognition for CFA based techniques. However, we should consider that positive recognitions of CFAs are usually made by someone in social proximity with the victim. This latter evidence strongly bias any face array test with unfamiliar assessors, keeping the question of CFA reliability still open.

6) Poster: “*Explorative 3D geometric morphometrics on crania and mandibles of Cercopithecini (1024 specimens)*” (Stefania Lo Bianco, Roberto Micciché and Luca Sineo).

6th congresso della European Federation for Primatology (EFP) in concomitanza col XXII Congresso dell'Associazione Primatologica Italiana (API), Roma, 25-28/08/2015.

Abstract

A dataset of crania and mandibles from Old World primates was investigated through the use of 3D Geometric Morphometrics. We focused the attention on the tribe Cercopithecini, sampling 1024 specimens preserved in 9 different museums and related to a total of 31 species. Other 102 specimens belonging to 10 species of the same family Cercopithecidae were added as outgroup.

Our sampling campaign was carried on with a 3D-digitizer Microscribe G2X and the data were processed through the softwares Morphologika and MorphoJ. We conducted both PCA and CVA analyses to investigate the power of resolution of the morphometric method and to understand the role of a-priori groups in the discrimination of the samples. Variables like sex, age and geographic localization, where present, were added to the analyses. Different sets of landmarks were selected with the aim to highlight those characters with major variability. Even if every skull shows a peculiar morphology, we were not able to go beyond the genus level for genera with many species inside.

We found that the a-priori specification is fundamental to obtain a clear clusterization of genera. The “sex” variable does not affect the reliability of the analyses, probably because factors we did not consider like body and teeth sizes have a strong impact on discrimination. In regard to the “age”, it can be notice that “infant” samples gather separated from “adult” ones, while “juveniles” lie in the middle. Surprisingly, we found a slight split between West and East Africa species.

The morphometric methodology can be helpful in the separation of species with deep morphometric differences or long evolutionary distances. Nevertheless, as in the tribe Cercopithecini most of the species show a recent history and similar lifestyle, it was not possible to discriminate up to the species level with this method. Thus, we consider more useful to adopt a genus level approach to design the evolutionary history of the tribe.

Keywords: Geometric Morphometrics · Cercopithecini · Crania · Mandibles

7) Presentazione orale e Poster: “3D Geometric morphometrics to investigate Cercopithecini evolution” (Stefania Lo Bianco and Luca Sineo). Primo Primate Day organizzato dall’Associazione Primatologica Italiana (API), Firenze, 25/10/2014.

Abstract

3D Geometric Morphometrics has been used on a preliminary dataset of 163 crania and 148 mandibles of primates. We sampled 27 species from Cercopithecidae and Hominidae, collected in 7 different museums. Our sampling campaign was carried on with the use of a 3D-digitizer Microscribe G2X and the data were processed through the software Morphologika. The preliminary PCA analyses on crania highlight the presence of two different groups, which distinguish some *Chlorocebus* and Unknown *Cercopithecus* samples from all the others. Regarding on mandibular shape analyses, we found a light cluster of *Cercopithecus* samples. The “Sex” variable does not affect the reliability of the analysis, probably because interspecific differences are greater than intraspecific ones. In regard to the “Age” variable, it can be notice that “infant” samples gather separated from “adult” ones, while “juveniles” lie in the middle. The morphometric methodology is very useful for evolutionary study, especially when the taxonomy of some samples is unknown. Furthermore, this is the first morphometric study on a so-wide survey of the entire Cercopithecini tribe.

Keywords: Geometric Morphometrics · Cercopithecini · Evolution · Crania · Mandibles

8) Presentazione orale e Poster: “La phylogenie des Cercopithecines <<encore en construction>>” (Luca Sineo et Stefania Lo Bianco). XXVIe Colloque della Société Francophone de Primatologie (SFDP), Kinshasa (Repubblica Democratica del Congo, RDC), 4-11/11/2013.

Resume

Les Cercopithecinés sont un groupe de singes africains qui se compose d'environ 36 espèces actuelles avec une évolution et une phylogénie très difficile à reconstruire.

L’approche classique tend à proposer de diviser le groupe en question en deux catégories: strictement arboricoles et terrestres. Au cours de cette présentation, nous analyserons de façon critique les différentes reconstructions phylogénétiques proposées aujourd’hui tout en conduisant une analyse sur la base des aspects moléculaires, chromosomiques et écologiques des espèces incluses dans le "groupe d'espèces" actuellement reconnues. Cette approche multidisciplinaire inclut la morphologie, l'écologie régionale ainsi que les résultats des recherches conduites dans les zones géographiques d’origine et démontre l’incohérence et l’insuffisance du point de vue traditionnel.

Mots-clés: Cercopithecines, Evolution, Phylogénie

9) Poster: “L’ibridazione interspecifica: evidenze e limiti di un fenomeno ancora da comprendere” (Stefania Lo Bianco e Luca Sineo). 74° Congresso dell’Unione Zoologica Italiana (UZI), Modena, 30/09-03/10/2013.

Abstract

L’interesse per l’aspetto evolutivo dell’ibridazione interspecifica è cresciuto negli ultimi anni, a giudicare dalla mole di articoli e *review* pubblicati sull’argomento. Fili conduttori di questi lavori sono la considerazione dell’ibridazione avvenuta e la conseguente ricerca delle evidenze che la dimostrano, siano esse morfologiche o genetiche: quasi mai l’evento di ibridazione viene messo in discussione, neppure quando le specie coinvolte sono caratterizzate

da sbilanciamenti aneuploidi molto forti.

Generalmente, l'ibridazione tra specie riconosciute come distinte è impedita dall'innescarsi di meccanismi d'isolamento pre- e post-zigotici. Questa incompatibilità ci porta a mettere in discussione la facilità con cui lo status di ibrido sia stato stabilito in questi lavori. Scopo della presente *review* è quello di investigare il trend del fenomeno nel tempo e i metodi utilizzati per analizzarlo. Prendendo come punto di partenza proprio l'approccio teorico di Dobzhansky, abbiamo analizzato criticamente la letteratura disponibile al riguardo, privilegiando le indagini effettuate sui mammiferi e, in modo particolare, sui primati, data la constatazione che anche minime evidenze di aneuploidia sono non vitali nell'uomo.

Il database che ne abbiamo ricavato ci ha permesso di verificare come l'interesse nei confronti dell'ibridazione sia cresciuto nel tempo e quanto il numero di specie soggette ad ibridazione sia aumentato. Tuttavia, nonostante l'evoluzione delle tecniche, alcuni lavori hanno privilegiato l'approccio morfologico: discriminante, ma non sufficientemente risolutivo. Gli studi che, invece, hanno investigato l'aspetto genetico si sono limitati a ricercare i riarrangiamenti cromosomici che caratterizzano l'ibrido (supposto).

La definizione di buona specie è spesso aleatoria, in quanto frutto di concetti che rappresentano categorie mentali. Non nascondendo che l'introggressione possa essere considerata un valido meccanismo di speciazione, non crediamo, tuttavia, che essa possa manifestarsi così facilmente in specie caratterizzate da profonde differenze genomiche.

Riteniamo che ulteriori indagini – in particolare, mediante approcci come l'ibridazione in situ miranti al confronto di ampie aree cromosomiche di omologia - siano necessarie per approfondire le nostre conoscenze su un fenomeno ancora in gran parte da comprendere.

7.4 ATTIVITÀ SVOLTE

- 25-28/08/15. 6th Congresso della European Federation for Primatology (EFP) in concomitanza del XXII Congresso dell'Associazione Primatologica Italiana (API), svoltosi a Roma.
- 01/06/14 – 01/08/14 e 03/06/15 – 31/07/15. Stage presso il Laboratorio di Tecnologie Diagnostiche Innovative dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Responsabile: Dr. Stefano Reale.
- 03 - 15/02/15 e 21/02 – 08/03/15. Periodo di formazione e campionamento morfometrico presso il Dipartimento di Zoologia ed Entomologia dell'Università di Fort Hare, ad Alice (Sudafrica). Responsabile: Prof.ssa Judith Masters.
- 16 - 20/02/15. Campionamento morfometrico presso l'Amathole Museum di King William's Town (Sudafrica). Responsabile: Sig.ra Buyiswa Mahala.
- 07/10/14 – 07/11/14. Campionamento morfometrico presso il Museum National d'Histoire Naturelle di Parigi (Francia). Responsabile: Dr. Jacques Cuisin.
- 16/06/14. Campionamento morfometrico presso il Museo di Storia Naturale di Milano. Responsabile: Dr. Giorgio Bardelli.
- 13/06/14. Campionamento morfometrico presso il Museo di Zoologia dell'Università di Bologna. Responsabile: Dr.ssa Maria Giovanna Belcastro.
- 09 – 12/06/2014. Terzo stage presso il Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università degli Studi di Firenze. Responsabile: Prof. Roscoe Stanyon.
- 09/06/14. Campionamento morfometrico presso il Museo di Antropologia ed Etnologia dell'Università di Firenze. Responsabile: Dr.ssa Monica Zavattaro.
- 05/06/14. Campionamento morfometrico presso il Museo di Storia Naturale dell'Università di Pisa, sito a Calci. Responsabile: Dr.ssa Carla Nocchi.
- 03 e 04/06/14. Campionamento morfometrico presso il Museo di Zoologia La Specola di Firenze. Responsabile: Dr. Paolo Agnelli.
- 17 – 25/04/14. Campionamento morfometrico presso il Museum of Zoology della Senckenberg Natural History Collection di Dresda (Germania). Responsabile: Dr.ssa Clara Stefen.
- 27/01 – 30/06/14. Internato nel Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo. Responsabile: Prof. Luca Sineo.
- 13 – 24/01/2014. Secondo stage presso il Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università degli Studi di Firenze. Responsabile: Prof. Roscoe Stanyon.
- 30/10 – 14/11/2013. Periodo di formazione e partecipazione al XXVIe Colloque della Société Francophone de Primatologie (SFDP), tenutosi a Kinshasa, nella Repubblica Democratica del Congo (RDC).
- 30/09 – 03/10/2013. 74° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana (UZI), con sede a Modena.
- 11 – 13/09/2013. XX Congresso dell'Associazione Antropologi Italiani (AAI), svoltosi a Ferrara.
- 03 – 05/05/2013. Spring School in “Metazoan phylogeny and evolution”, organizzata dall'Unione Zoologica Italiana (UZI) e tenutasi a Venezia presso l'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti.
- 18/02 – 28/06/13. Internato nel Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche dell'Università degli

- Studi di Palermo. Responsabile: Prof. Luca Sineo.
- 04 – 15/02/2013. Primo Stage presso il Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica dell'Università degli Studi di Firenze. Responsabile: Prof. Roscoe Stanyon.

8. RINGRAZIAMENTI

Un lavoro della durata di tre anni accumula, per ovvi motivi, un sostanzioso numero di ringraziamenti doverosi ma sentiti.

Innanzitutto, ringrazio tutti coloro che hanno contribuito da un punto di vista professionale alla realizzazione di questo traguardo. Il Prof. Luca Sineo per avermi permesso di portare avanti il progetto di ricerca e per aver fornito laboratori, contatti e materiali citogenetici, provenienti da una campagna in Sudafrica (*C. mitis*), da un prelievo SCLAVO-Novartis (*C. aethiops sabaeus*) e da una collaborazione con la Dott.ssa Antonella Fiorello del Bioparco di Sicilia (*C. petaurista*). Il Prof. Franco Palla per aver messo a disposizione lo strumento per il campionamento morfometrico (Microscribe) e il Prof. Roscoe Stanyon per la disponibilità, l'accoglienza e l'accesso a laboratori e materiali (le sonde cromosomiche umane e i campioni di *E. patas* e *M. sylvanus* del National Cancer Institute, USA). La Prof. Judith Masters e il Dott. Fabien Genin per l'ospitalità, il supporto sul campo, l'accesso alla collezione osteologica dell'Università di Fort Hare e i preziosi consigli. Il Dott. Stefano Reale, la Dott.ssa Barbara Manachini e il Prof. Vincenzo Arizza per le interessanti collaborazioni che sono nate. La Dott.ssa Francesca Dumas per avermi affiancato durante alcuni esperimenti in laboratorio. Il Dott. Mario Lo Valvo e il Prof. Paul O'Higgins dell'Università di York per i preziosi consigli durante l'elaborazione statistica dei dati morfometrici. La Dott.ssa Antonella Lannino per l'aiuto in laboratorio, i consigli, il supporto e la prorompente comicità. Un ringraziamento particolare va al Dott. Roberto Micciché per il tempo, i consigli, il supporto durante la stesura del protocollo morfometrico e la fase di analisi dei dati, ma soprattutto per l'immancabile ottimismo. Ai ragazzi del laboratorio di Antropologia per tutte le occasioni di crescita e alla collega Vita Lombardo per i bellissimi disegni di Cercopithecini che spontaneamente ha realizzato per questa tesi. I direttori dei musei, i curatori delle collezioni e i loro collaboratori che hanno permesso il campionamento morfometrico: Paolo Agnelli, Museo La Specola, Firenze; Carla Nocchi, Museo di Storia Naturale, Calci; Monica Zavattaro, Museo di Antropologia e Etnologia, Firenze; Maria Giovanna Belcastro, Museo di Zoologia, Bologna; Giorgio Bardelli, Museo di Storia Naturale, Milano; Uwe Fritz, Melita Vamberger, Clara Stefen e Jens Jakobitz del Museo di Zoologia presso la Senckenberg Natural History Collection, Dresda; Jacques Cuisin e Aurélie Verguin del Bâtiment d'Anatomie comparée del Museo Nazionale di Storia Naturale, Parigi; Fred Kigozi, Buyiswa Mahala e i loro collaboratori presso l'Amathole Museum, King William's Town.

Grazie a tutti gli amici e alle persone care per avermi confermato il loro immancabile sostegno e per tutti i momenti di condivisione, mancanza di serietà e presenza di zibibbo.

Ringrazio sopra ogni cosa l'occasione che mi è stata concessa di poter svolgere questo dottorato, per le possibilità di crescita e affermazione personale.

E per avermi portato nuovi amici e nuovi legami, avrà sempre la mia gratitudine.